



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**APROTİNİNLİ ve APROTİNİNSİZ SERUM ve
PLAZMA ÖRNEKLERİNDE İRİSİN
SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ**

Ecem İMAMOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. E. Edip KEHA

TRABZON-2015

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ecem İMAMOĞLU'nun hazırladığı **“Aprotininli ve Aprotininsiz Serum ve Plazma Örneklerinde İrisin Seviyesinin Belirlenmesi”** başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. E. Edip KEHA

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. E. Edip KEHA

Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE

Yrd. Doç. Dr. Meltem MALKOÇ

Tarih: 09/07/2015

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

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 09.07.2015

Ecem İMAMOĞLU

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tez çalışmam süresince her aşamada göstermiş olduğu hoşgörü, inanç ve desteğinden dolayı değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. E.Edip KEHA'ya,

Yüksek lisans eğitimimde büyük emekleri olan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Birgül V. KURAL, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE ve Yrd. Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN'a,

Çalışmam sırasında yardımlarını benden esirgemeyen, destek ve katkıları ile her zaman yanımda olan Arş.Gör. Diler US ALTAY ve Arş.Gör. Elif MARAP ŞAHİN'e,

Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm araştırma görevlisi, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Tüm aşamalarda varlığını hissettiğim İlkay HANDIRI, kadim dostlarım Cansu ALBAY, Dr. Ezgi DEMİR ve her daim yanımda olan sevgili aileme en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Ecem İMAMOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Miyokinler	5
4.2. İrisin	7
4.2.1. İrisinin Yapısı, Biyosentezi ve Düzenlenmesi	7
4.2.2. İrisinin Biyokimyasal Etkileri ve Dokular Arası Dağılımı	9
4.2.3. İrisin ve Egzersiz	11
4.2.4. İrisin ve Obezite	11
4.3. Serin Proteazlar	12
4.4. Aprotinin	13
5. GEREÇ ve YÖNTEM	16
5.1. Gereç	16
5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasallar	16
5.2. Yöntem	17
5.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	17
5.2.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Çalışmaya Hazırlanması	17
5.2.3. Plazma ve Serum Örneklerinde ELISA Yöntemi kullanılarak İrisin Seviyesinin Belirlenmesi	17
5.2.4. İrisin Standart Grafiği	18
5.3. İstatistiksel Analizler	19

6.	BULGULAR	20
6.1.	Serum ve Plazma Örneklerinde İrisin Seviyesi	20
6.2.	Serum Örneklerine Aprotinin İlavesinin İrisin Seviyesine Etkisi	20
6.3.	Plazma Örneklerine Aprotinin İlavesinin İrisin Seviyesine Etkisi	21
7.	TARTIŞMA ve SONUÇ	22
8.	KAYNAKLAR	26
9.	EKLER	32
9.1.	Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	32
10.	ETİK KURUL ONAYI	37
11.	ÖZGEÇMİŞ	38

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları	16
Tablo 2.	Aprotininsiz serum ve plazma irisin seviyesi (ng/mL)	20
Tablo 3.	Aprotinin ilave edilmiş serumların irisin seviyesi (ng/mL)	20
Tablo 4.	Aprotinin ilave edilmiş kan plazmaların irisin seviyesi (ng/mL)	21

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Egzersiz PGC1- α , FNDC5 ve irisin oluşumuna etkisi	8
Şekil 2.	FNDC5 ve irisin salınması	9
Şekil 3.	İrisinin etki mekanizması	10
Şekil 4.	Sığır aprotininin çizgisel ve 3 boyutlu gösterimleri	14
Şekil 5.	İrisin standart grafiği	19

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

Arg	Arginin
AMPK	5' Adenozin Monofosfat ile Aktive Edilen Protein Kinaz
BDNF	Beyin Türevli Nörotrofik Faktör
Cys	Sistein
FNIII	Fibronektin III
FNDC5	Fibronektin Tip III Domainini içeren 5. Protein
FGF-21	Fibroblast Büyüme Faktörü-21
Ile	İzolösin
IL-1	İnterlökin-1
IL-1ra	İnterlökin1 Reseptör Antagonisti
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IL-10	İnterlökin-10
IL-12	İnterlökin-12
IL-15	İnterlökin-15
LIF	Lösemi Önleyici Faktör
Lys	Lizin
Met	Metiyonin
PGC1-α	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü- β
TIU	Tripsin Ünitesi
UCP-1	Uncoupling Protein-1

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

1. ÖZET

APROTİNİNLİ ve APROTİNİNSİZ SERUM ve PLAZMA ÖRNEKLERİNDE İRİSİN SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ

İrisin, miktarı PGC1- α tarafından düzenlenen, 112 amino asitten oluşan bir miyokindir. Bir tip I integral membran proteini olan FNDC5'in proteolitik parçalanması sonucu iskelet kası dokusundan kan dolaşımına salınır. İrisin, glukoz toleransını ve enerji harcanmasını arttırırken, karbohidrat homeostazını iyileştirir. Aprotinin çok değerlikli bir serin proteaz inhibitörüdür. Serum, plazma veya hücre homojenizatu gibi sulu çözelti örneklerine eklenerek, ortamda bulunan serin proteaz enzimlerini inhibe eder. Bu şekilde, ölçümü yapılacak olan proteinlerin parçalanması önlenir. Laboratuarlarda çeşitli biyolojik örneklerde araştırma amacı ile irisin ölçümü ELISA metodu ile yapılmaktadır. Çok defa -80 °C'de uzun süre saklanma ihtiyacı duyulan örneklerde irisin kaybının olup olmayacağı hakkında bir ön bilgi elde etmek amacı ile bu çalışma yapılmıştır. Bu amaçla, 25-40 yaş arasında 10 erkek ve 10 kadın gönüllüden kan örnekleri alınmış ve bunlardan elde edilen plazma ve serum örneklerine aprotinin eklenerek 3 ay -80 °C'de saklanmıştır. 3 ay sonra, ELISA ile aprotininli ve aprotininsiz örneklerde irisin seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesiyle, aprotininli ve aprotininsiz plazma örneklerindeki irisin miktarlarında önemli bir farklılık olmadığı gözlemlenirken ($p=0.525$), aprotininli ve aprotininsiz serum örneklerindeki irisin miktarlarında anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p=0.009$). Sonuç olarak, ELISA ile irisin tayin edilmek üzere 3 ay civarında -80 °C'de saklanan plazma ve serum numunelerine aprotinin eklenmesinin gerekip gerekmediği konusunda net bir kanaate varılamamıştır.

Anahtar Sözcükler: Aprotinin, FNDC5, İrisin, Miyokin, Serin Proteaz.

2. SUMMARY

DETERMINATION of IRISIN LEVELS in SERUM and PLASMA SAMPLES WITH and WITHOUT APROTININ

Irisin is a myokine with 112 amino acids and its level is regulated by PGC1- α . It is released into blood circulation from skeletal muscle tissue after a proteolytic cleavage of extracellular domain of FNDC5, a Type I integral membrane protein. Irisin improves carbohydrate homeostasis by increasing glucose tolerance and energy expenditure. Aprotinin is a polivalent serine protease inhibitor. It is added to the sample solutions such as serum, plasma or tissue extracts in order to inhibit the serine proteases found in the sample medium. So, degradation of the proteins to be measured can be prevented. In laboratories, irisin is measured by ELISA method in the researches made with several biological samples. This study has been made to get a preliminary information in order to see if any irisin loss could be seen in these samples which are frequently needed to be kept at -80 °C for a long time. For this purpose, blood samples have been taken from 10 men and 10 women volunteers with ages between 25-40 and aprotinin has been added to the plasma and the serum samples which have been obtained from these blood samples and have been kept at -80 °C for 3 months. At the end of 3 months, irisin levels of these samples with aprotinin and without aprotinin have been determined by ELISA. Statistical analysis of the results has shown an insignificant difference between the plasma samples with or without aprotinin ($p=0.525$) and a significant decrease between the serum samples with and without aprotinin ($p=0.009$). In conclusion, with the results of this study, no net decision could have been achieved to add aprotinin to the samples for irisin determination with ELISA in plasma and serum kept at -80 °C for about 3 months.

Key Words: Aprotinin, FNDC5, Irisin, Myokine, Serine Protease.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Obezitenin, kardiyovasküler hastalık, tip 2 diyabet, uyku apnesi ve hipertansiyon gibi yaygın olan birçok hastalıkla ilişkili olduğu ve bu hastalıkları tetiklediği ortaya konmuştur. Bu nedenle, hastalığın yaygınlığını azaltmak için tedavi stratejilerinin geliştirilmesi oldukça önemli bir ihtiyaçtır. İskelet kas hücreleri otokrin, parakrin ve endokrin etkisi olan sinyal sitokin peptitleri salgırlar. Son zamanlarda, özellikle fiziksel aktivite sırasında veya hemen sonrasında, iskelet kasının dolaşıma birçok hormonu salgıladığı bulunmuştur. Miyokinler olarak adlandırılan bu hormonlar metabolizmayı etkileyebilir ve farklı doku ve organlarda sitokin üretimini değiştirirler. Buna dayanarak, iskelet kası kavramı yeniden ele alınmış ve gerçek bir endokrin organ olarak değerlendirilmiştir. Miyokinlerin egzersiz ile salınımının arttığı ve bu nedenle obezite tedavisinde önemli rollerinin olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (1).

İrisin, PGC1- α tarafından düzenlenip, "Type 1" membran proteini olan FNDC5 (Fibronectin type III domainini içeren 5. protein)'in proteolitik olarak parçalanması sonucu kaslardan kana salınan 112 amino asitlik polipeptid yapılı bir miyokindir (2). İrisini, Boström ve arkadaşları ise kan glukoz seviyesini düzenleyen (glukoz homeostazı), kilo kaybına sebep olan özellikleri ile diyabet ve obezite tedavisinde hedef olarak gösterilmiş ve gelecek vadeden bir miyokin olarak tanımlamışlardır. Temel fonksiyonu beyaz yağ dokusunu, kahverengi yağ dokusuna çevirerek enerjinin ısı olarak ortaya çıkmasını sağlamaktır. Egzersizle uyarılan irisinin; kilo kaybı, insülin direncinde azalma, şişmanlık ile ilişkili olması, glukozun düzenlenmesi ve lipid metabolizmasındaki etkileri gibi birçok fizyolojik özelliğinin olduğu bilinmektedir.

Proteazlar, doğada çok çeşitli olarak bulunan proteinlerdeki peptid bağlarının kırılmasını katalizleyen enzim grubudur. Bütün canlı organizmalarda bulunan proteazlar, hücrenin gelişmesi ve farklılaşması için gereklidir. Proteinlerin hidrolizinde spesifik katalitik role sahiptirler. Bu enzimler, çok çeşitli olmalarının yanında metabolizma, gen ekspresyonun regülasyonu, patojenite ve transportta büyük protein moleküllerinin küçük moleküllere hidrolizi ve bunun gibi biyolojik olaylarda önemli görevler yapmaktadır.

Aprotinin sığır akciğerinden elde edilen, kandaki mevcut serin proteaz enzimlerine bağlanarak inhibisyonlarına sebep olan doğal bir polipeptiddir. Tersinir olarak enzim-inhibitör kompleksleri oluşturarak insan tripsini, plazmini, plazma kallikreini ve doku kallikreini üzerinde inhibitör etki yapar (3).

İrisin ile ilgili yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmaktadır. Bazen yapılan çalışmalarda materyal örneklerinin toplanması uzun bir sürede gerçekleştiğinden, örneklerin bir süre derin dondurucuda saklanması gerekmektedir. Çalışılan örneklerde her zaman proteolitik enzimler mevcut olacağından, saklanma şartlarında ve süresi içinde ihtiva ettikleri proteinleri farklı derecelerde tahrip etmeleri beklenir. Bu durumdan yola çıkarak, irisin seviyesinin belirlenmesinde kan ve serum örneklerine proteaz inhibitörü olan aprotininin ilave edilmesinin gerekip, gerekmediğinin bu çalışma ile ortaya konulması hedeflenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Miyokinler

İskelet kasının parakrin ve otokrin etkilere sahip miyokin adı verilen birçok sitokini eksprese edip salgılayabilme özelliği bulunmaktadır. Miyokinler, kas fiberlerinde üretilip salgılanan peptidlerdir. Sitokinler farklı hücre grupları tarafından sentezlenebilirler. İskelet kası, miyokin olarak adlandırılan bu peptidleri sentezlemesi açısından endokrinolojik organlar sınıfına dahil edilmiştir. Egzersiz ile iskelet kasından salgılanan birçok miyokin mevcuttur. Bunlardan interlökin-6 (IL-6) egzersize verilen yanıtta ilk ortaya çıkan miyokindir ve egzersize cevaben yaklaşık 100 katlık bir artış göstermektedir. Yapılan birçok çalışmada, ortaya çıkan IL-6 artışında monositlerin etkisinin olmadığı ve bu artışın kas hasarından bağımsız olduğu belirlenmiştir (4,5). IL-6 seviyesindeki bu artış egzersizden sonra giderek azalmaktadır. Kasın ürettiği IL-6 miktarındaki artış, egzersizin süresi, yoğunluğu, vücut tarafından yapılan işe katılan kas kitlesiyle ilişkili bulunmuştur. Bununla beraber çok az miktarda IL-6'nın egzersize cevaben, yağ doku, beyin ve peritendon dokulardan da salınabileceği gösterilmiştir (4). IL-6 cevabındaki bu artışı IL-1ra ve IL-10 seviyelerindeki artış takip eder. İskelet kasından TNF- α salınımı tespit edilmemiştir (6,7). Egzersize cevaben kandaki seviyesinde artış gözlenen diğer bir miyokin olan IL-12'nin, rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. IL-6 gibi, egzersize yanıt olarak salgılanan diğer miyokin ise interlökin 8'dir. Kemotaktik ve nötrofil aktive edici özelliği dışında, IL-8 bir anjiogenik faktördür. Şiddeti giderek artan koşu gibi bir egzersize cevap olarak plazma konsantrasyonunda artış tespit edilmiştir. Sabit bir egzersize yanıt olarak plazma IL-8 düzeylerinde bir artış gösterilememiştir. Bir saatlik bisiklet egzersizlerini izleyen dönemde plazma IL-8 düzeylerinde bir değişiklik bulunamamışken, yapılan kas biyopsilerinde mRNA düzeylerinde artış olduğu belirlenmiştir (5,6).

Yakın zamanlarda çalışılan egzersiz ile ilişkili diğer bir sitokin ise IL-15'dir. IL-15 mRNA seviyelerinin, direnç antrenmanlarını takip eden 24 saatte arttığı bulunmuştur. Yapılan iskelet kası hücre kültürü çalışmalarında IL-15'in glukoz alımını module ettiği ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar, IL-15'in diyabetin önlenmesinde önemli rolü olabileceğini göstermiştir (8).

Miyostatin, transforme edici büyüme faktörü- β süper ailesinin (TGF- β ailesi) bir üyesidir, iskelet kası gelişiminin güçlü bir negatif regülatörüdür ve insanlardan kemirgenlere kadar birçok türde korunmuştur. Miyostatin, 375 amino asitten oluşan ve 25 kDA ağırlığına sahip, iskelet kas hücrelerinde üretilip kana salınan ve kas dokusunu etkileyen bir miyokindir. Follistatin ise TGF- β süper ailesinin bir diğer üyesidir ve iskelet kası gelişimini düzenler, miyostatinin etkisini inhibe ederek kas kütlesinin normal düzeyde artışına sebep olur. BDNF (Beyin türevli nörotrofik faktör) iskelet kasında glukoz kullanımını arttırarak, iskelet kası metabolizmasını regüle eden bir miyokindir (9). Egzersiz sonrasında BDNF beyin çeşitli bölgelerinde, özellikle hipokampusta fazla miktarda bulunur. Bunun dışında, timus, karaciğer, dalak, adipoz doku, böbrek, prostat, mide, trake, iskelet kası, endotel hücreleri, ince bağırsak, retina, kalp, akciğer, immun sistem hücrelerinde ve tükrük gibi birçok dokuda bulunmaktadır. İskelet kası BDNF'sinin, tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıklarda önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Lösemi önleyici faktör (LIF) yeni keşfedilen miyokinlerden biridir. Kas hasarı ve yaralanmalarından sonra kaslardaki LIF mRNA'sının arttığı belirlenmiştir. Bu anlamda LIF kas bozulmalarına karşı etkileriyle, kas hücrelerinden izole edilebilen bir miyokin olarak tanımlanmıştır (10,11).

SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine), ilk olarak kemikte tespit edildiği için osteonektin olarak adlandırılmıştır. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, SPARC'nin yağ birikimini azaltarak glukoz metabolizmasını düzenleyen bir miyokin olduğu belirlenmiştir (12,13). Yapılan çalışmalarda, kas gelişimi ve rejenerasyonu sırasında, SPARC'nin miyoblastlarda, miyotüplerde ve kas lifleri içerisinde bol miktarda bulunduğu ortaya konulmuştur (14). Wash ve arkadaşları, bir diğer miyokin olan FGF-21'i (fibroblast büyüme faktörü-21) iskelet kasında üretildiğini göstererek onu miyokin sınıfına dahil etmişlerdir. Egzersize bir cevap olarak salgılanan bu miyokin, birçok metabolik mekanizmayı etkiler. FGF-21 verilen diyabetli kemirgen hayvanların plazmalarında glukoz ve trigliseridin azaldığı, insülin duyarlılıklarının ise arttığı gözlenmiştir (15,16).

Bu anlamda miyokinler, son yıllarda yapılan birçok çalışmaya konu olmuştur. Özellikle kas kasılmasının miyokinlerin üretimi ve salgılanmasındaki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır. Sitokinler ve diğer peptidler gibi miyokinler de küçük hücre sinyalizasyonunda görev almaktadır. Miyokinler, diğer hücrelerin davranışlarını

etkilediği gibi bazen hücrenin kendini yenilemesinde de rol oynar. Bununla birlikte, doku onarımı ve yenilenmesi, immünomodülasyon, yağ kütlesinin azaltılması gibi fonksiyonlarından dolayı egzersiz fizyolojisinde özel bir öneme sahiptirler. Miyokinlerin, AMPK yolunu uyarması ve lipolizi düzenlemesiyle metabolik hastalıkların önlenmesinde potansiyel bir tedavi seçeneği olacağı düşünülmektedir. Ayrıca miyokinlerin tip 2 diyabet ve obezite gibi metabolik bozukluklar üzerinde olumlu etkileri de mevcuttur. Kas dokusundan salgılanan, egzersizle indüklenen ve çalışmamıza konu olan miyokin ise irisindir.

4.2. İrisin

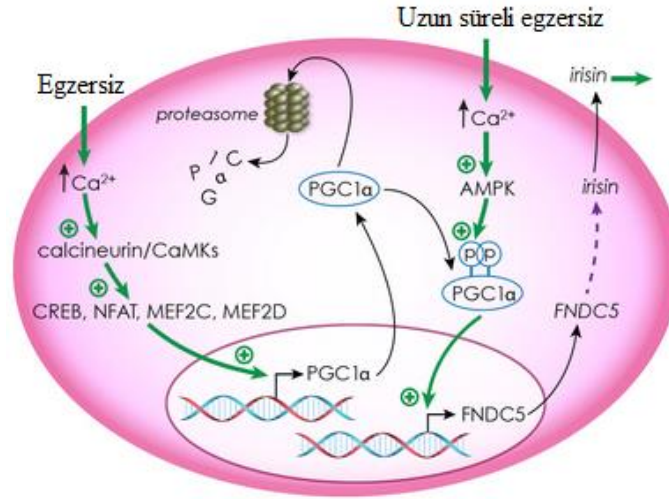
İrisin Boström ve arkadaşları tarafından ilk defa 2012 yılında kas dokusundan izole edilmiştir. Miktarı PGC1- α tarafından düzenlenen ve bir çeşit “Type 1” membran proteini olarak bilinen FNDC5’in proteolitik parçalanması sonucu kaslardan kana salınır. İrisin, beyaz adipoz dokuyu kahverengi adipoz dokuya dönüştürerek enerji sarfiyatına neden olur (17).

4.2.1. İrisinin Yapısı, Biyosentezi ve Düzenlenmesi

İrisin miyokin sınıfına dahil olan ve en son tanımlanan miyokindir (18). 12 kDa molekül ağırlığına ve 112 amino asite sahip olan bu molekülün kaslarda miktarı PGC1- α (PPAR γ koaktivatör-1 α), tarafından düzenlenir. PGC1- α enerji metabolizması ile ilgili birçok biyolojik programlara aracılık eden bir transkripsiyon koaktivatörüdür. Bu koaktivatör, UCP1 (“uncoupling” protein 1)’in ekspresyonunu düzenler ve kahverengi yağ dokusunda termogenezin oluşumuna katkı sağlar. FNDC5’in oluşmasını ve onun parçalanarak kaslarda irisinin salgılanmasını sağlayan PGC1- α ’nın ekspresyonu egzersiz sırasında kas kasılmasıyla birlikte hızlı bir şekilde artar (19).

İskelet kası kasılması, kalsiyum sinyali ile uyarılan motor nöronları tarafından başlatılır. Kas hücrelerinde artan kalsiyum miktarı, protein fosfataz kalsinörin ve kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinazların aktivasyonunu sağlar. Bu şekilde birçok koaktivatör ve transkripsiyon faktörünün fosforilasyonu artar (20). Egzersiz hızlı ve güçlü bir şekilde PGC1- α ’nın ekspresyonunu artırır fakat bu artış geçicidir. Çünkü hem mRNA seviyesi hem PGC1- α ’nın düzeyi hızlı bir şekilde egzersiz öncesindeki ilk haline geri döner (21). Egzersiz aynı zamanda hücresel ve organizmal metabolizmanın ana düzenleyicisi olan AMPK’yı aktive eder (Şekil 1). AMPK, PGC1- α ’yı

fosforilleyerek aktivasyonunu gerçekleştirir. Aktifleşen PGC1- α , FNDC5'in artışına yol açar ve irisin FNDC5'in karboksi terminalinden ayrılarak kas hücrelerinden salınır (22). Hafif ve kısa süreli egzersizler PGC1- α 'da geçici yükselişler oluştururken, uzun ve güçlü egzersizler kalıcı yükselişe sebep olur.

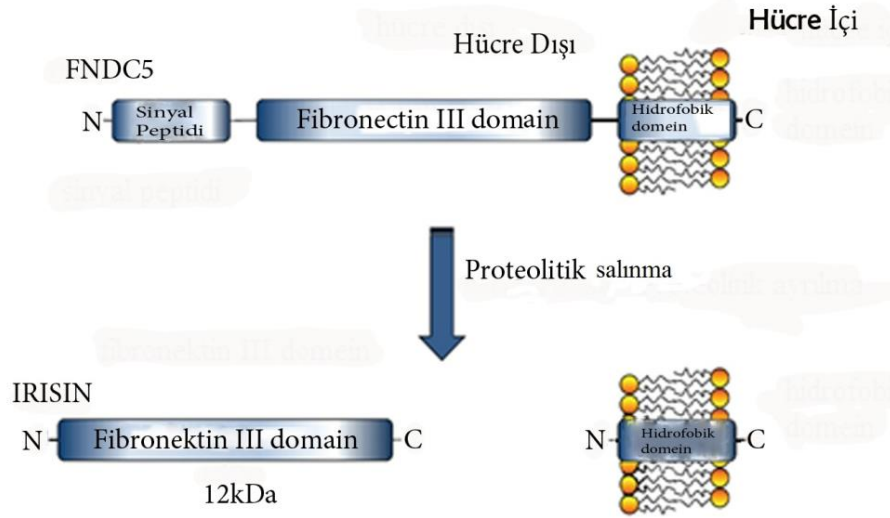


Şekil 1. Egzersizin PGC1- α , FNDC5 ve irisin oluşumuna etkisi (Cayman'dan, 23).

İrisin, iskelet kasında bulunan FNDC5'in bir proteazla parçalanması sonucu oluşur (17). FNDC5, ilk kez 2002 yılında iki bağımsız grup tarafından keşfedilerek karakterize edilmiştir. FNDC5, bir sinyal peptidi, iki fibronektin "domain" ve hücre membranına gömülü bir hidrofobik "domain"den oluşur (24,25). Yaklaşık 32 kDa'luk bir moleküler ağırlığa sahip olan transmembran FNDC5, dolaşımda bulunan FNDC5'ten, yani, irisinden daha büyüktür (17,26).

FNDC5, amino(N)-terminal ucunda fibronektin "domain" ile bir sinyal peptidi ve karboksi (C)-terminal domaininde lipid ikili tabaka içine yerleşmiş bir hidrofobik "domain"den oluşur. Fare FNDC5'inin ilk 29 amino asiti sinyal peptididir, hemen ardından 94 amino asitlik tekli FNIII domaini gelir. Bir sonraki 28 amino asitlik bölgenin yapısı ve fonksiyonu henüz bilinmemektedir fakat irisin için tahmini bir bölünme bölgesi içerdiği düşünülmektedir. Bunu 19 amino asitlik transmembran "domain" ve 39 amino asitlik sitoplazmik "domain" takip eder. Bu yapı "Type I"

membran proteini olarak sentezlenir ve daha sonra proteolitik olarak parçalanır (Şekil 2). Fare ve insan irisininin % 100 özdeş olduğu belirlenmiştir (17).



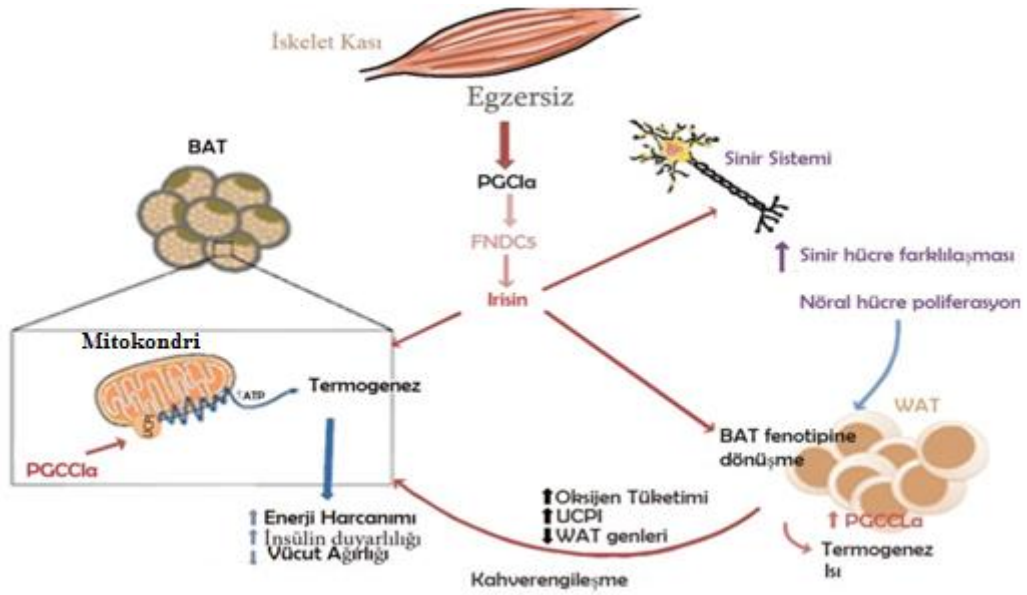
Şekil 2. FNDC5 ve irisin salınması (Novelle'den, 27).

FNDC5'ten ayrılan irisin dolaşımına beyaz adipoz dokudaki (WAT) henüz bilinmeyen reseptörlere bağlanarak onu kahverengi adipoz dokuya (BAT) dönüştürür. Kahverengi adipoz doku, çok lipid damlacıklı hücrelerden oluşmaktadır ve beyaz adipoz dokuyla karşılaştırıldığında yüksek miktarda mitokondri ihtiva eder (28,29).

4.2.2. İrisinin Biyokimyasal Etkileri ve Dokular Arası Dağılımı

İrisin, enerji deposu olarak kullanılan beyaz adipoz hücrelerinin bir kısmını, enerjiyi ısı üretiminde kullanan kahverengi yağ hücrelerine dönüştürür. Bu işleme 'kahverengileşme' denir. UCP proteinleri oksidatif fosforilasyonda, proton gradienti oluşumunu azaltan transmembran proteinleridir ve kahverengi adipoz doku hücrelerinin mitokondri iç membranında bulunur (30,31). İrisin, kahverengi adipoz dokuyu etkileyerek, mitokondri membranında proton taşınımına katılan UCP1'in aktivasyonunu artırır. Bunun sonucunda üretilen ATP, ısı oluşumunda kullanılarak harcanır. Bu işlem, enerji harcanımını artırarak kilo kaybının artması ve insülin duyarlılığı gibi metabolik parametrenin iyileşmesine sebep olur. Kahverengi adipoz doku bebeklerde vücut sıcaklığının düzenlenmesine katkıda bulunduğu bilinmesiyle birlikte, yetişkin

fizyolojisiindeki fonksiyonu irisin hormonu keşfine kadar bilinmemekteydi (17). Bundan dolayı irisinin izolasyonu, büyük ölçüde metabolik olayların ve adipoz doku metabolizmasının açıklanmasında yardımcı olmuştur (32). İrisinin adipoz doku metabolizmasına etki ettiği gibi, sinir sistemine de etki ettiği düşünülmektedir. Bu miyokinin, sinir hücresi proliferasyonunu ve farklılaşmasını da indükleyerek, Alzheimer veya Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar için terapötik bir hedef olabilir (Şekil 3).



Şekil 3. İrisinin etki mekanizması (Novelle' den, 27).

İrisin sentezinin büyük bir kısmının iskelet kas dokusunda gerçekleştiği öne sürülmüş ancak yapılan immünohistokimyasal çalışmalar, irisinin kalp kası bağ dokusundan ve miyokardından da bol miktarda sentezlendiğini ortaya koymuştur (17). Sıçanlarda kalp kas dokusu ve iskelet kas dokusundaki miligram doku başına irisin miktarları hesaplandığında, kalp kası dokusundaki irisinin daha çok olduğu bulunmuştur (33). İrisinin iskelet kasının perimisyum, endomisyum ve çekirdek bölgelerinde immünoreaktif bir özelliği mevcuttur (33). Yüksek irisin seviyesinden düşük irisin seviyesine sahip olan dokular şu şekildedir; kas, rektum, perikard, intrakranial arter, kalp, dil, optik sinir, uvula, beyin, yumurtalık, yumurta kanalı, hipofiz veziküller, böbreküstü bezi, yemek borusu, vena kava, böbrek, penis, retina, testis, üretra, mesane,

spinal kord, karaciğer, ince bağırsak, bademcik, tiroid ve vajina (34). İrisin adipoz dokudan da salgılanır. Bu nedenle, araştırmacılar irisini miyokin ailesine ek olarak, adipokin ailesine de dahil etmişlerdir (2,17).

4.2.3. İrisin ve Egzersiz

Egzersiz, vücut kompozisyonu, metabolik sağlık, kardiyovasküler hastalık ve ruh sağlığı üzerindeki olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, iskelet kasının kasılmasına yanıt olarak (örneğin, egzersiz) iskelet kas hücrelerinin otokrin, parakrin ve endokrin etki gösteren sitokin/peptitleri sinyallerini salgıladığı kabul edilmiştir (35). Boström ve arkadaşları egzersiz sonrasında farelerde ve insanlarda iskelet kasında FNDC5 mRNA'sının arttığını rapor etmişlerdir (17). Ayrıca, diyabetik olmayan erkek denekler 10 haftalık aerobik egzersiz programına tabi tutulmuş ve egzersiz öncesi ve sonrası kan örnekleri ve kas biyopsileri alınmış, egzersiz sonrası alınan örnek sonuçlarında, irisin miktarının fazla olduğu bulunmuştur (36). İrisin salgılanmasının egzersiz ve ısıyla ilişkisi olup olmadığı da araştırılmıştır. Aydın ve arkadaşları, obez ve sağlıklı bireyleri iki gruba ayırmış ve bir grup min. 45 dakikalık egzersiz programına tabii tutulmuş, diğer grup ise min. 45 dk, 50 °C'de Türk hamamında duş aldırılmıştır (37). Araştırmacılar irisin miktarının egzersiz ve duş sonrasında arttığını, ancak Türk banyosundan sonra irisinin büyük bir miktarının dolaşıma salgılandığını ve tükrüğe geçtiğini bildirmişlerdir (37). İrisin istirahat halinde iskelet kasındaki permissyumda bulunur fakat egzersizle salınımı daha da artar. Bundan dolayı, irisin sadece egzersiz sonrası salgılanmaz, kanda bazal miktarda da mevcuttur (33).

4.2.4. İrisin ve Obezite

Obezite, organizmadaki yağ kütesinin artışıyla karakterize edilen ve gittikçe büyüyen bir sağlık problemidir. İrisin termojenik özelliğinden dolayı, yağ kütesinin azaltılmasında önemli bir role sahiptir. Yapılan çalışmalarda, irisin düzeyleri kontrol edildiğinde, obez bireylerde 353.1 ± 18.6 ng/mL iken kontrol gruplarında 198.4 ± 7.8 ng/mL olarak bulunmuştur. İrisin düzeyleri kadınlarda 353.1 ± 18.6 ng/mL ve erkeklerde 267.6 ± 12 ng/mL olarak bildirilmiştir. Bu rapora göre irisin düzeyleri cinsiyete bağlı ve erkeklere oranla kadınlarda daha yüksektir (38). Ayrıca, dolaşımdaki irisin miktarı, obezitede hiperglisemiye bir cevap olarak artar fakat tıpkı insülin ve leptin gibi

duyarlılığı azalır. İrisin düzeyi kilo kaybı ile azaldığı için dolaşımdaki irisin seviyesinin vücut yağ kitlesinin bir göstergesi olabileceği de ileri sürülmüştür (39). Obezite ameliyatı geçiren obez hastalardan, ameliyat sonrasındaki 6. ayda alınan iskelet kası ve serum örneklerinde, kastaki FNDC5 mRNA'nın ve dolaşımdaki irisin miktarının düştüğü gözlenmiştir (34). Bu sonuca göre araştırmacılar, enerji kısıtlaması ve cerrahi olarak indüklenmiş kilo kaybının irisin seviyesini azalttığı sonucuna varmıştır (34). Genç ve yaşlı farelerde irisin miktarları karşılaştırıldığında, genç olanların serumlarında daha çok irisin bulunmuştur. İrisinin yüksek miktarda bulunması yağ yıkımını hızlandırır; Bu nedenle, obezitenin gençlere oranla yaşlılarda daha sık görülmesinin irisin miktarının gençlerde daha fazla olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Böylece irisinin, metabolizma ile ilişkili birçok hastalıkta (obezite, T2DM...) önemli rolü olduğu yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur.

4.3. Serin Proteazlar

Proteazlar, proteinazlar veya peptidazlar organizmada sentezlenen proteinlerin kompozisyonunun, büyüklüğünün, biçiminin ve döngüsünün kontrolünde esansiyel olan enzimlerdir ve her türlü organizmada bulunan mevcut proteinlerin toplam miktarının yaklaşık % 2'sini temsil etmektedir (40). Bu enzimler kanın pıhtılaşması, kontrollü hücre ölümü ve doku farklılaşması gibi yaşam için önemli biyolojik süreçlerde rol oynar.

Proteazlar dört mekanik sınıfa ayrılırlar. Bunlar; serin proteazlar, metaloproteazlar, aspartik proteazlar ve sistein proteazlardır. Son yıllarda çeşitli proteaz inhibitörleri kullanılarak bu proteaz sınıflarının diğer üyeleri de belirlenmeye çalışılmaktadır (40). Serin proteazlar, birçok biyolojik yollarda aynı zamanda hücre ve hücre dışı proteinlerin modülasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (41). Farklı hastalık durumlarında farklı tipte proteazlar rol oynar. Bu enzimlerin inhibitörlerinin bilinmesi yeni terapötik ajanların geliştirilmesi açısından önemlidir (42). Triptaz, kimaz, karboksipeptidaz, katepsin C ve G gibi nötral proteazlar özellikle insan ve rat mast hücrelerindeki salgı granüllerinin dominant protein unsurlarıdır ve seçici olarak bu hücrelerde lokalize olurlar (40). Bu proteazlar, ökaryotlarda, prokaryotlarda, arke ve virüsler bulunabilir. Kimotripsin benzeri proteazlar sindirim, hemostaz, apoptoz, sinyal

iletimi, çoğalma ve immün cevap da dahil olmak üzere bir çok önemli fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır.

Katalitik serin rezüdöleri ihtiva ettiğinden dolayı serin peptidazlar peptidazların en büyük grubunu oluşturur. Serin peptidazları arasında en bol bulunan ise tripsindir. Bu enzimler, sindirim (tripsin, kimotripsin), bağışıklık, kan pıhtılaşması (faktör VIIa, IXa, Xa, XIIa), fibrinoliz (ürokinaz, doku plazminojen aktivatörü, plazmin, kallikrein) de dahil olmak üzere, pek çok önemli fizyolojik süreçlere katılır.

Serin proteazlar aktif bölgelerinde serin amino asidi bulundurmasıyla tanınan enzim sınıfı olup endopeptidaz özelliğindedir (43,44). Bu yapı içinde serin, substrat ile kovalent bağ oluşturan oldukça reaktif bir unsurdur (44). Bu proteazlar granüllerdeki düşük pH nedeniyle pozitif yüklüdür ve negatif yüklü proteoglikan zincirleriyle sıkı bir kompleks oluşturur. Bu etkileşim, elektrostatik itmeyi azaltarak granüller içindeki proteazların sıkıca paketlenmelerine olanak verir. Degranülasyon sonrasında bu enzimler nötr pH'lı bir ortama salınırlar (42). Çoğu mast hücre proteazları bu bölgelerde proteoglikanlarla yaptıkları makromoleküler kompleksler halinde kalırlar. Bazı durumlarda ekzositozla dışarıya verilen proteaz/ proteoglikan komplekslerinin aşırı büyüklüğü, proteazların dokulardaki difüzyonunu fiziksel olarak engeller (43). Bunların tanımlanması ve sınıflandırılmaları, molekül ağırlıkları ve aktiviteleri göz önünde bulundurularak yapılır.

Kanda bulunan, kan pıhtılaşma faktörleri dışındaki ve hücrelerden sızıntı yoluyla kana geçen elastaz, vb. serin proteazlar alfa antitripsin benzeri bir takım fizyolojik proteaz inhibitörleri tarafından inhibe edilerek kan proteinlerinin gereksiz parçalanmaları önlenmiş olur. Bu çalışmada kandaki mevcut irisin miyokininin, serin proteazlar tarafından parçalanmasını önlemek amacıyla kuvvetli bir serin proteaz inhibitörü olan aprotinin kullanılmıştır.

4.4. Aprotinin

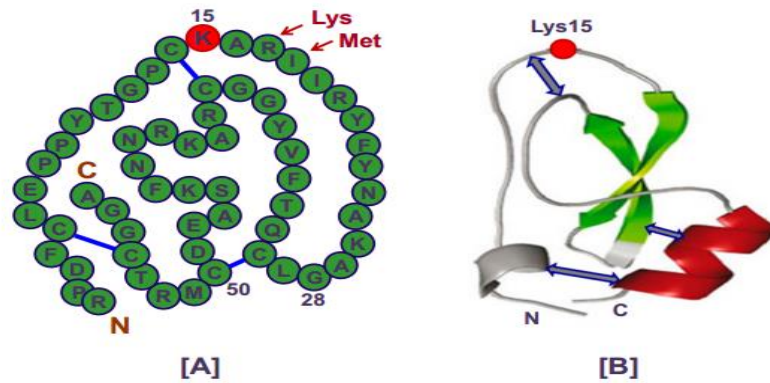
Doğal bir polipeptid olan aprotinin 1930 yıllarında Kraut tarafından sığır akciğerinden izole edilmiştir. Aprotinin dönüşümlü stokiyometrik enzim inhibitör kompleksleri oluşturarak insan tripsini, plazmini, plazma kallikreini ve doku kallikreini üzerinde inhibisyon yapar. Aprotininin moleküler eşdeğeri sığır pankreas tripsin inhibitörü 1936 yılında Kunitz ve Northrop tarafından tanımlanmıştır (45). Preperat

olarak ilk kez 1959 yılında kullanıma sunulan aprotininin günümüzde rekombinant DNA teknolojisi ile üretimi ve kullanımı da mevcuttur (46,47).

Pankreatik tripsin inhibitörü olarak da bilinen aprotinin, üç disülfid köprüsüyle çapraz bağlanmış iki küçük polipeptit zincirinden oluşur. 6.5 kDa ağırlığında moleküler ağırlığı ve izoelektrik pH'sı 10.9 olan, 58 amino asitten ibaret bir polipeptiddir (3,48).

Aprotininin inflamasyon ile hemostatik ve pıhtılaşma fonksiyonları üzerinde etkileri vardır. Hasarlı bölgede enflamasyon ve pıhtılaşmanın kontrollü olarak gerçekleştirilmesi gerekir. Bu kontrol araçlarından birisi de aprotinin benzeri inhibitörlerdir. Bu inhibitörlerin birçoğu doğal kaynaklardan elde edilip medikal ve deneysel amaçlarla insan ve hayvanlarda da kullanılabilir. Aprotinin de bunlardan birisidir.

Aprotininin yapısındaki β -tabaka ve α -heliks yapıları, çapraz disülfid bağlarıyla (Cys5-Cys55, Cys14-Cys38, Cys30-Cys51) kararlı bir tersiyer yapı meydana getirir (Şekil 4). Aprotininin bu kararlı yapısı bilinen proteazların denatürasyon ve proteolitik parçalama etkilerine karşı kuvvetli bir direnç oluşturur. Ayrıca, bu kararlı yapıdan dolayı bu molekülün % 2'lik trikloroasetik asit, % 70'lik metanol ve etanol veya % 50'lik aseton çözeltilerinde aktivitesini kaybetmediği de görülmüştür (49).



Şekil 4. Sığır aprotininin çizgisel (A) ve 3 boyutlu (B) gösterimleri (Helland'dan, 50).

Tersiyer yapıdaki α -heliks ve β -tabaka yapıları sırasıyla kırmızı ve yeşil ile gösterilmiştir (B). Antiproteaz aktif merkezindeki Lys-15 kırmızı daire ile gösterilmiştir. Disülfid bağları mavi oklarla gösterilmiştir.

Aprotinin, farklı hayvan türleri arasında bulunan ve yüksek ölçüde korunmuş bir polipeptittir. Son yıllarda insan aprotinini rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmeye başlanmıştır. İnsan aprotininde, sığır aprotininde bulunan 58 amino asitten sadece ikisi farklı olup Arg17-Ile18 amino asitleri yerine Lys17-Met18 aminoasitleri bulunmaktadır (53).

Aprotinin insanda medikal amaçla kullanıldığında yapısındaki Lys-15 amino asidi hedef proteinin aktif serin bölgesine sıkı bağlanarak, plazmin, tripsin, kallikrein, kimotripsin, aktive edilmiş protein C, trombin ve nötrofil elastaz gibi birçok proteazın inhibisyonuna sebep olur (3). Aprotinin-tripsin kompleksi için ayrışma katsayısı $K_i=6 \times 10^{-14}$ mol/L olup, bu rakam bir protein-protein etkileşimi için rapor edilen en yüksek afiniteyi ifade etmektedir (52). Bundan dolayı, proteaz saflaştırılması için iyi bir afinite ligandı olarak da kullanılmaktadır. Bununla birlikte, aprotinin trombin ve elastaz gibi bazı proteazlarla daha düşük bir bağlanma gerçekleştirir (3,48). Aprotinin sadece serbest enzim moleküllerine bağlanmakla kalmaz, enzim bir üçüncü maddeyle bağlı olsa bile, aktif merkeze ulaşılabilirdiği sürece enzime bağlanır. Ayrıca aprotinin, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda kullanılan önemli bir proteaz inhibitörüdür. Klinik olarak, kalp ameliyatı ve organ naklinde aşırı kan kaybını önlemek amacıyla kullanılır (53). Güçlü bir antiproteaz olan aprotinin, deneysel olarak plazma ve serumdaki proteinlerin proteolizini, saklanma süreci içerisinde önlemek amacı ile çalışılan örneklerle ilave edilir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar, Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve kimyasal maddelerin listesi üretici firmaları ile birlikte Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri, kimyasal maddeler ve üretici firmaları

Kullanılan Cihazlar, Laboratuvar Malzemeleri ve Kimyasallar	Üretici Firma
Otomatik pipetler	Socorex, Isolab
Santrifüj	Eppendorf, Centrifuge 5810
Saf Su Arıtma Cihazı	Kros
Derin Dondurucu (-80°C)	Thermo Electron Corporation
Farma	-86°C ULT Freezer
İnkübatör	Shel Lab Shaking Incubator
ELISA yıkayıcısı	Biotek
Vorteks	IKA Vortex, Genius 3
Mikroplate Okuyucusu	Molecular Devices VersaMax
FNDC5/irisin ELISA kiti	SunRed
Aprotinin	SIGMA A6279
Pastör Pipet	
Eppendorf Tüpler	
Pipet Uçları	
Örnek Tüpleri (EDTA’lı ve EDTA’sız)	

5.2. Yöntem

5.2.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Tez çalışması, sağlıklı gönüllüler üzerinden alınan kan örneklerinde yapılmıştır. Çalışmamızda, 25-40 yaş arasında 10 erkek ve 10 kadın gönüllüden kan örnekleri alındı. Gönüllü bireylerin seçiminde, gebelik, akut ve kronik böbrek ve karaciğer rahatsızlıkları, sindirim-emilim bozukluğu, koroner arter hastalığı, diyabet, hipertansiyon, kanser ve endokrin bozukluk, menopoz hali, düzenli ilaç, sigara ve alkol kullanımı dışlama kriterleri olarak belirlendi.

Çalışmaya dahil olan gönüllülere çalışma ile ilgili aydınlatıldı. Çalışmada yer alan gönüllülerin aydınlatılmış onamları alındı (Bkz. Ek. Onam Formu Örneği).

Çalışmanın yürütülebilmesi için, K.T.Ü. Tıp Fakültesi, Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu'ndan 2014/159 dosya numarası ve 8 numaralı karar ile onay alınmıştır (Bkz. Etik Kurul Onayı).

5.2.2. Kan Örneklerinin Alınması ve Çalışmaya Hazırlanması

Bu çalışma için 20 sağlıklı kişiden sabah aç karına 2'si antikoagulan olarak EDTA içeren, 2'si EDTA'sız olmak üzere 4 tüp kan alındı. Bu tüplerden EDTA'lı ve EDTA'sız birer tanesine aprotinin ilave edildi. İlave edilen aprotinin miktarı, bir mL kan için 0.6 TIU (tripsin ünitesi) kadardır. Buna göre EDTA'lı tüpe 45 µL, EDTA'sız olana 75 µL konuldu. Tüplerin tümü 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Plazma ve serumdan ibaret olan süpernatantlar 1 mL' lik ependorf tüplerine aktararak -80 °C'de 3 ay süre ile irisin ölçümü için bekletildi.

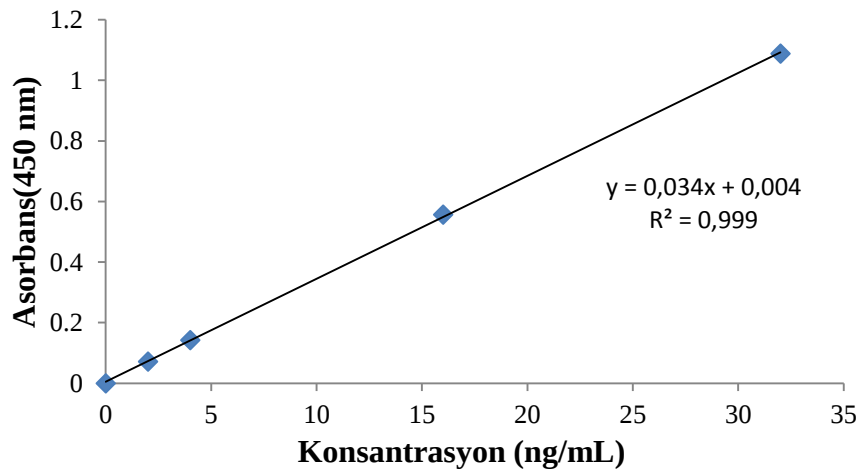
5.2.3. Plazma ve Serum Örneklerinde ELISA Yöntemi Kullanılarak İrisin Seviyesinin Belirlenmesi

Plazma ve serum irisin ölçümünde SunRed firmasının 201-12-5328 katalog nolu insan irisini için üretilen ELISA kiti kullanılarak serum ve plazmadaki ölçümleri kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümden gerçekleştirilen çalışma basamakları aşağıdaki gibidir.

- -80 °C'deki numuneler oda sıcaklığına getirildi.
- Kit paketinde bulunan ve konsantrasyonu 64 ng/mL olan irisin standart çözeltisi, ELISA ölçümlerinde kullanılmak üzere konsantrasyonları 32, 16, 8, 4, 2 ng/mL olacak şekilde seyreltilerek standart örnekleri hazırlandı
- Standartlar sırası ile 50 µL olacak şekilde kuyucuklara yüklendi ve içinde standart bulunan her bir kuyucuğa 50 µL Streptavidin-HRP eklendi. Kör için ayrılan kuyucuğa kromojen A, kromojen B ve Streptavidin-HRP eklendi.
- Diğer kuyucuklara sırası ile 40 µL numune ve numune bulunan her kuyucuğa 10 µL irisin-antikoru ve 50 µL Streptavidin- HRP eklendi. Sonrasında pleyt folyo ile kapatılarak çalkalayıcıda 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Kitten çıkan yıkama tamponu 30 kat seyreltildi.
- İnkübasyon sonrası pleyt, pleyt yıkayıcıda yıkama tamponu ile yıkandı ve kuyucuklarda kalan artık yıkama tamponu tamamen uzaklaştırıldı.
- Her bir kuyucuğa renklendirme için kromojen A ve B çözeltilerinden 50'şer µL eklendi. 37 °C'de karanlıkta 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- Standartların rengi maviye döner dönmez her bir kuyucuğa 50 µL renklenmeyi durdurma çözeltisi eklendi ve numunelerin renginin sarıya döndüğü gözlemlendi.
- 450 nm dalga boyunda absorbanlar ölçüldü.

5.2.4. İrisin Standart Grafiği

Kit protokolüne uygun şekilde yapılan serum ve plazmadaki irisin ölçümünden elde edilen standart grafiği Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5. İrisin standart grafiği.

5.3. İstatistiksel Analizler

Çalışma sonrasında elde edilen analiz sonuçları; aritmetik ortalama, $\pm$ standart sapma ($X \pm SD$) olarak ifade edildi. Deney sonuçları, SPSS (Statistics Program for Social and Science) 13.0.1 (Lisans numarası: 9069727) istatistik programına yüklenerek normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov Testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uyan; bağımlı parametrelerin ikili karşılaştırılmasında Paired t testi kullanıldı. İstatistiksel testlerdeki sonuçların $p < 0.05$ olması anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Serum ve Plazma Örneklerinde İrisin Seviyesi

10 erkek ve 10 kadın gönüllüden alınan kanlardan elde edilen serum ve plazmalarda ölçülen irisin miktarlarının, kadın erkek bir arada olarak, ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 2’de verilmiştir. İstatistiksel analiz sonucuna göre serum ve plazma örneklerindeki irisin seviyeleri arasında önemli bir fark olduğu görülmektedir ($p=0.009$).

Tablo 2. Aprotininsiz serum ve plazma irisin seviyeleri (ng/mL)

Parametreler	Serum Numuneleri n=20	Plazma Numuneleri n=20	p
İrisin	12.7±6.30	9.56±4.40	0.009

p, " Paired t testi" ne göre verilmiştir.

6.2. Serum Örneklerine Aprotinin İlavesinin İrisin Seviyesine Etkisi

Aprotininsiz veya aprotinin ilave edilerek çalışılan serum örneklerinde ölçülen irisin miktarlarının, kadın erkek bir arada olarak, ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 3’te verilmiştir. Burada verilen aprotininsiz serum ortalama değerleri Tablo 2’deki serumlara ait değerlerdir. İstatistiksel analiz sonucuna göre aprotininli ve aprotininsiz serum örneklerindeki irisin seviyeleri arasında önemli bir fark olduğu görülmektedir ($p=0.008$).

Tablo 3. Aprotinin ilave edilmiş serumların irisin seviyesi (ng/mL)

Parametreler	Serum Numuneleri n=20	Serum+Aprotinin Numuneleri n=20	p
İrisin	12.7±6.30	10.4±4.49	0.008

p, "Paired t testi" ne göre verilmiştir.

6.3. Plazma Örneklerine Aprotinin İlavesinin İrisin Seviyesine Etkisi

Aprotininsiz veya aprotinin ilave edilerek çalışılan plazma örneklerinde ölçülen irisin miktarlarının, kadın erkek bir arada olarak, ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4’de verilmiştir. Burada verilen aprotininsiz plazma ortalama değerleri Tablo 2’deki plazmalara ait değerlerdir. İstatistiksel analiz sonucuna göre aprotininli ve aprotininsiz plazma örneklerindeki irisin seviyeleri arasında önemli bir fark olmadığı görülmektedir ($p=0.525$).

Tablo 4. Aprotinin ilave edilmiş plazma irisin seviyesi (ng/mL)

Parametreler	Plazma Numuneleri n=20	Plazma+Aprotinin Numuneleri n=20	p
İrisin	9.56±4.40	10.2±4.64	0.525

p, "Paired t testi" ne göre verilmiştir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Miyokinlerin keşfine kadar, kas dokusunun sadece hareketi sağlamada ve iskeleti dik tutarak organizmaya şeklini vermeye katkısı olduğu düşünülmekteydi. Son yıllarda ise iskelet kasının endokrin bir organ olduğu gösterilmiştir. İskelet kasının parakrin ve otokrin etkilere sahip miyokin adı verilen birçok sitokini eksprese edip, salgılayabilme özelliği bulunmaktadır. İrisin de bu miyokinler sınıfında tanımlanan en son miyokindir (1).

Yakın bir geçmişte varlığından haberdar olunan irisinin insanlardaki rolüyle ilgili çalışmalar az olduğundan, fonksiyonu tam olarak ortaya koyulamamıştır. Ayrıca, bazı çalışma sonuçları kimi zaman birbiriyle çelişse de, kana salınmasının egzersizle indüklendiği, bazı beyaz yağ hücrelerini kahverengi yağ hücrelerine dönüştürerek, enerji sarfiyatını artırdığı ve bunun sonucu olarak da, DM, obezite, kronik böbrek yetersizliği gibi bazı metabolik hastalıkları iyileştirici yönde etkili olabileceği şeklinde yaygın görüşler bulunmaktadır (1,2). Henüz, hücre membranlarındaki reseptörleri başta olmak üzere, aydınlatılmamış birçok yönü bulunan irisin ile ilgili yapılan çalışmalar gün geçtikçe artmakta ve bu miyokinin biyokimyasal mekanizması, metabolik bozukluklara etkisi gibi birçok yönü araştırma konuları arasında yerini almaktadır. Bu maksatla, dokuda irisinin veya onun öncülü FNDC5'in ekspresyonu mRNA ölçümüyle veya irisinin kan dolaşımındaki seviyesi serum ve plazmada ELISA metoduyla belirlenmektedir.

K.T.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında, yaklaşık üç yıldır, insan ve bazı deney hayvanlarında irisinle ilgili çalışmalar yapılmakta, bu hormonun serum ve plazma seviyeleri ELISA ile ölçülmektedir. Bazen, yapılan çalışmalarda materyal örneklerinin toplanması uzun bir sürede gerçekleştiğinden, örneklerin bir süre derin dondurucuda -80 °C'de saklanması gerekmektedir. Bu örneklerin saklanma şartlarında ve süresi içinde ihtiva ettikleri proteinlerin farklı derecelerde proteolize maruz kalabileceğini düşünüyoruz. Bundan dolayı, belli bir süre bu şekilde saklanan kan ve serum örneklerine proteaz inhibitörü olan aprotininin ilave edilmesinin gerekip, gerekmediği ile ilgili bir ön bilgi edinmek için -80 °C'de üç ay süreyle muhafaza edilen serum ve plazma örnekleriyle böyle bir çalışma planlanmıştır.

Aprotinin etkisini ortaya koymak için gönüllülük esasıyla 10 erkek ve 10 kadından alınan kanlara aprotinin ilave edilerek ve edilmeyerek serum ve plazmalar oluşturulmuştur. Üç ay süre ile -80 °C’de bekletildikten sonra bu örneklerde ELISA yöntemi ile irisin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Tezde ifade edilmeyen sonuçlara göre kadın ve erkek gruplar arasında hem plazma hem de serumda önemli bir fark gözlemlenmediğinden hepsi 20 kişilik bir havuz içinde gösterilmiştir. Kadınlardaki ve erkeklerdeki irisin düzeyleri ile ilgili yapılan çalışmalarda farkı sonuçlar bulunmuştur. Crujeiras ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, irisin düzeyleri kadınlarda 353 ± 18.6 ng/mL ve erkeklerde 267.6 ± 12 ng/mL olarak bildirilmiştir. Bu rapora göre “irisin düzeyleri cinsiyete bağlı ve erkeklere oranla kadınlarda daha yüksektir” sonucuna ulaşmışlardır (38). Fakat, Choi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, serum irisin seviyelerinin erkeklerde, kadınlardan daha yüksek olma eğiliminde olduğu fakat, her iki cinsiyet arasında istatistiksel olarak önemli fark olmadığı bulunmuştur (52.9 ± 32.7 , 45.8 ± 30.9 , $p=0.063$). Bundan dolayı serum ve plazma örneklerinde cinsiyet açısından irisin seviyesinde, bir hastalık yokken anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır (54). Zaten bu çalışma, proteaz inhibisyon etkisi ile ilgili bir ön bilgi edinmek amacı ile yapıldığından kadın ve erkek değerler arasında bir fark bulunmuş olsaydı da, bunları bir havuz içinde toplanmasının bir şey fark ettirmeyeceği düşünülmüştür.

Çalışılan numunelerin saklanması -80 °C genelde kullanılan bir sıcaklıktır. Aslında bu sıcaklık daha uzun süre saklamalar için de yeterlidir. Üç aylık süre ise tezin yetişmesi için akademik bir zorunluluk olup ve bir ön bilgi edinme amacı için yeterli bulunmuştur.

Bu çalışmada, aprotinin ilave edilmemiş serum ve plazma örnekleri bağımlı iki grup olarak değerlendirilmiş ve bu gruplarda irisin seviyeleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ($p=0.009$). Bununla ilgili sonuçlar Tablo 2’de verilmiştir. Bu tabloda serum örneklerindeki irisin miktarı ortalaması 12.7 ± 6.30 ng/mL, plazmadaki ise 9.56 ± 4.40 ng/mL olarak bulunmuştur. Literatürde, aynı şahısların hem serum hem de plazma örneklerinde ELISA ile irisin ölçümünün yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısı ile bir karşılaştırma yapılması mümkün olmamıştır. Ancak, bu farklılığın ELISA yönteminde kullanılan monoklonal antikorların plazma ve serum bileşiminde bulunan farklı protein çeşitleriyle farklı çapraz etkileşmeler yapmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Aprotinin ilave edilmiş ve edilmemiş plazma ve serum örnekleri bağımlı iki grup olarak düşünülmüştür. Plazma örneklerine aprotinin ilavesi, irisin seviyesini değiştirmemiş ve 2 grup arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır ($p=0.525$). Aprotininsiz plazma numunelerindeki irisin miktarı 9.56 ± 4.40 ng/mL, aprotininli plazma numunelerindeki irisin miktarı 10.2 ± 4.64 ng/mL bulunmuştur (Bkz. Tablo 4). Buradan, bir ön bilgi olarak, plazma örneklerine aprotinin ilavesinin ELISA ile irisin tayininde gerekmediği sonucu elde edilmiştir. Bununla birlikte, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'lik bir sıcaklığın, 3 ay süre içinde proteaz aktivitesine karşı örneği koruyabildiği de düşünülebilir.

Aynı şekilde serum örneklerinde yapılan ölçümlerde, daha farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Aprotininsiz serum örneklerindeki irisin miktarı 12.7 ± 6.30 ng/mL, aprotininli serum örneklerindeki irisin miktarı 10.4 ± 4.49 ng/mL bulunmuştur (Bkz. Tablo 3). İrisin ölçümleri ve istatistiksel değerlendirme sonucuna göre, serum örneklerine aprotinin ilavesinin irisin seviyesini anlamlı olarak azalttığı görülmüştür ($p=0.008$). Bu azalmanın nedeni, aprotininin serin proteazlara bağlanarak oluşan aprotinin-proteaz kompleksinin proteaz enziminin bağlanma bölgesiyle irisine bağlanıp, irisini parçalayamamasına rağmen, ELISA antikorunun bağlanacağı epitopu kapatarak irisinin eksik ölçülmesine yol açması olabilir. Kan plazmasında ise, bu aprotinin-proteaz kompleksleri koagülasyon proteinlerine bağlanmış halde olabileceğinden irisin molekülleri korunabileceği düşüncesini vermektedir.

Ancak, bu sonuçlardan yola çıkarak, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de uzun süre muhafaza edilen serum ve plazma örneklerine aprotinin eklenmesinin gerekliliği ile ilgili, ön bilgi mahiyetinde olsa dahi, net bir fikir vermemektedir. Bu husus; 1- irisin miktarını ölçmede kullanılan ELISA kitlerinin özellikleri 2- çalışmada kullanılan örnek sayısı ve saklanma süresi çerçevesinde tartışılabilir. Dünya çapında birçok laboratuvar da metabolizma-egzersiz ilişkisi üzerinde, irisinin bir rolünün olup olmadığını öğrenmek için araştırmalar yapılmaktadır. İrisin yeni tanımlanan bir miyokin olduğu için yapılan çalışmanın sonuçlarında çelişkilere rastlanmaktadır. Mesela, Timmons ve arkadaşlarının, iskelet kasında FNDC5 artışının egzersiz ile ilişkili olup olmadığını ortaya çıkarmak için yaptıkları bir çalışmada, 24 genç erkeğin dahil olduğu 6 haftalık yoğun egzersiz programı sonunda, bu kişilerden alınan iskelet kası biyopsilerinde FNDC5 mRNA miktarında hiçbir farklılık bulunmamıştır (55). Fakat benzer bir çalışmada diyabetik

olmayan erkek denekler 10 haftalık egzersiz programına tabi tutulmuş ve egzersiz sonrası alınan kan örneklerinde ELISA ile ölçülen irisin miktarlarında artış gözlemlenmiştir (36). FNDC5'in değişmeyip irisinin artmış görünmesi, egzersizin FNDC5 ekspresyonunu değil, proteolitik kopma ile irisin salınmasını arttırdığını düşündürmekle beraber ELISA ile yapılan ölçümlerin, tutarsızlığından da kaynaklanabileceği ifade edilmelidir. Bu tutarsızlıkların ELISA kitlerinde üretici firma tarafından ölçülmesi için hedeflenen irisin epitoplarındaki çeşitlilikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmalarda, immünoeseylerde çapraz reaksiyon proteinleri olabileceği ve alınan sonuçların sadece irisine ait olmama ihtimali mevcuttur. Bu amaçla yapılan bir çalışmada 4 irisin antikoru incelenmiş, bu antikordardan 3 tanesinin mevcut ELISA kitlerinde kullanıldığı bulunmuştur. Çalışma sonucunda bütün antikorların plazma ve serumlarında irisin olmayan proteinlerle baskın bir şekilde çapraz reaksiyon verdiği görülmüştür. Bundan dolayı, çalışmalarda, FNDC5'in mRNA seviyesindeki ekspresyonu ölçülse bile, kana proteolizle salınan irisinin miktarı hakkında bir bilgi vermemektedir (56). Çünkü, salgılanan veya irisin gibi proteoliz sonucu salıverilen proteinlerin, dolaşımdaki miktarlarıyla, ekspresyonları arasında zayıf bir ilişki vardır (57,58). Serum ve plazma örneklerinde irisin ölçümü için üretilen ELISA kitlerindeki monoklonal antikorların farklı epitoplarının olmasının yanı sıra analitik kriterlere uygunlukları tam olarak oturtulmadan piyasaya sürüldüğü, bu alanda çalışanlar tarafından sıklıkla ifade edilmektedir (59). Bu nedenle FNDC5/irisin aminoasit dizilimini doğru bir şekilde ölçmek için metodlar geliştirilmelidir. Tüm bunlar göz önüne alındığında irisinin ELISA ile ölçümü net bir kesinlik sağlamamaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan örnek sayısı, bir ön bilgi edinme amacı ile yapıldığından, aprotininin ilavesinin gerekli olup olmadığını ortaya koymak için oldukça az görülmektedir. Kesin bir sonuca varmak için toplamda en az 50 kişiden alınan örnekler değerlendirilmelidir. Çalışılan örnek sayısının arttırılmasıyla bu belirsizliğin önlenebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, kan örneklerinin toplandığı ilk günde ve yalnızca 3 ay sonra değil, -80 °C'de 6 ay ve bir senelik muhafazalarının ardından da irisin ölçümlerin yapılması daha doğru ve güvenilir bir kanaate varılmasını sağlayacaktır.

8. KAYNAKLAR

1. So B, Kim H, Kim J (2014). Wook Song Exercise-induced myokines in health and metabolic diseases. *Integrative Medicine Research* 3: 172-179.
2. Roca-Rivada A, Castela C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Crujeiras AB, Seoane LM, Casanueva FF, Pardo M (2013). FND5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *Plos One* 8: e60563. doi:10.1371/0060563.
3. Fritz, H, Wunderer, G (1983). Biochemistry and application of aprotinin, the Kallikrein inhibitor from bovine organs. *Arzneim Forschung Drug Research*. 33: 479-494.
4. Petersen AMW, Pedersen BK (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology* 98: 1154-1162.
5. Pedersen BK, Akerström TCA, Nielsen AR, Fischer PC (2007). Role of myokine in exercise and metabolism. *Journal of Applied Physiology* 103: 1093-1098
6. Lippincott W, Lippincott W (2006). *ACSM's Advanced Exercise Physiology*. (Ed: Tipton CM). Philadelphia, 3-8.
7. Nielsen S, Pedersen BK (2008). Skeletal muscle as an immunogenic organ. *Current Opinion in Pharmacology* 8: 342-351.
8. Busquets S, Figueras MT, Meijding S, Carbo N, Quinn LS, Almendro V, Argiles JM, Lopez-Soriano FJ (2005). Interleukin-15 decreases proteolysis in skeletal muscle: a direct effect. *International Journal of Molecular Medicine* 16: 471-476.
9. Yamanaka M, Tsuchida A, Nakagawa T, Nonomura T, Ono-Kishino M, Sugaru E, Noguchi H, Taiji M (2007). Brain-derived neurotrophic factor enhances glucose utilization in peripheral tissues of diabetic mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9: 59-64.
10. Broholm C, Mortensen OH, Nielsen S, Akerstrom T, Zankari A, Dahl B, Pedersen BK (2008). Exercise induces expression of leukemia inhibitory factor in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 586: 2195-2201.
11. Kurek JB, Bower JJ, Romanella M, Koentgen F, Murphy M, Austin L (1997). The role of leukemia inhibitory factor in skeletal muscle regeneration. *Muscle and Nerve* 20: 815-822.

12. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR (1981). Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26: 99-105.
13. Song H, Guan Y, Zhang L, Li K, Dong C (2010). SPARC interacts with AMPK and regulates GLUT4 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396: 961-966.
14. Kupprion C, Motamed K, Sage EH (1998). SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 29635-2940.
15. Walsh K (2009). Adipokines, myokines and cardiovascular disease. *Circulation Journal* 73: 13-18.
16. Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, Shanafelt AB (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 1627-1635.
17. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Hojlund K, Gygi SP, Spiegelman BM (2012). A PGC1- α dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis. *Nature* 481: 463-468.
18. Vamvini MT, Aronis KN, Panagiotou G, Huh JY, Chamberland JP, Brinkoetter MT, Petrou M, Christophi CA, Kales SN, Christiani DC, Mantzoros CS (2013). Irisin mRNA and circulating levels in relation to other myokines in healthy and morbidly obese humans. *Eur J Endocrinol* 169: 829-834.
19. Handschin C, Spiegelman BM (2008). The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature* 454: 463-469.
20. Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M (2000). Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiological reviews* 80: 1215-1265.
21. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD (2003). Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 546: 851-858.

22. Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, Meier CA, Bell DR, Kralli A, Giacobino JP, Deriaz O (2003). Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes* 52: 2874-2881.
23. Cayman Chemical USA. (2015) Electronic resources [online]. Available from: <https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2192>.
24. Ferrer-Martinez A, Ruiz-Lozano P, Chien KR (2002). Mouse PeP: A novel peroxisomal protein linked to myoblast differentiation and development. *Developmental Dynamics* 224: 154-167.
25. Teufel A, Malik N, Mukhopadhyay M, Westphal H (2002). Frcp1 and Frcp2, two novel fibronectin type III repeat containing genes. *Gene* 297: 79-83.
26. Erickson HP (2013). Irisin and FNDC5 in retrospect: an exercise hormone or a trans-membrane receptor. *Adipocyte* 2: 289-293.
27. Novelle MG, Contreras C, Romero-Pico A, Lopez M, Dieguez C (2013). Irisin, Two Years Later. *International Journal of Endocrinology* Article ID 746281. doi: 10.1155/746281.
28. Lidell ME, Enerback S (2010). Brown adipose tissue – a new role in humans. *National Review Endocrinology* 6: 319-325.
29. Enerback S (2010). Brown adipose tissue in humans. *International Journal of Obesity* 34: 43-46.
30. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem* 47: 53-67.
31. Affourtit C, Quinlan CL, Brand MD (2012). Measurement of proton leak and electronleak in isolated mitochondria. *Methods Mol Biol* 810: 165-182.
32. Polyzos SA, Kountouras J, Shields K, Mantzoros CS (2013). Irisin: a renaissance inmetabolism. *Metabolism* 62: 1037-1044.
33. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Eren MN, Celik A, Yilmaz M, Kalayci M, Sahin I, Gungor O, Gurel A, Ogeturk M, Dabak O (2013). Cardiac, skeletal muscle and serum irisin responses to with or without water exercise in young and old male rats: cardiac muscle produces more irisin than skeletal muscle. *Peptides* 52: 68-73.

34. Huh JY, Panagiotou G, Mougios V, Brinkoetter M, Vamvini MT, Schneider BE, Mantzoros CS (2012). FND5 and irisin in humans. I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. *Metabolism* 61: 1725-1738.
35. Pedersen BK, Febbraio MA (2012). Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology* 8: 457-65.
36. Besse-Patin A, Montastier E, Vinel C, Castan-Laurell I, Louche K, Dray C (2014). Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine. *Int J Obes (Lond)* 38: 707-713.
37. Aydin S, Aydin S, Kuloglu T, Yilmaz M, Kalayci M, Sahin I, Cicek D (2013). Alterations of irisin concentrations in saliva and serum of obese and normal-weight subjects, before and after 45 min of a Turkish bath or running. *Peptides* 50: 13-18.
38. Crujeiras AB, Pardo M, Arturo RR, Santiago NC, Zulet MA, Martínez JA, Casanueva FF (2014). Longitudinal variation of circulating irisin after an energy restriction-induced weight loss and following weight regain in obese men and women. *American Journal of Human Biology* 26: 198-207.
39. Stengel A, Hofmann T, Goebel-Stengel M, Elbelt U, Kobelt P, Klapp BF (2013). Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity – correlation with body mass index. *Peptides* 39: 125-30.
40. Harem MK (2005). *Journal of Health Sciences* 14: 61-67.
41. Beynon RJ, Bond JS (2001). *Proteolytic enzymes: a practical approach*. 2nd ed. Oxford/New York: Oxford University Press, 23-24.
42. Henningsson F, Wolters P, Chapman HA, Caughey GH, Pejler G (2005). Mast cell cathepsins C and S control levels of carboxypeptidase A and the chymase, mouse mast cell protease 5. *Biol Chem* 384: 1527-1531.
43. Chugunova E (2004). *Biological Function of Mast Cell Chymase*. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
44. Schechter NM, Brass LF, Lavker RM, Jensen PJ (1998). Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts. *Journal of Cell Physiol* 176: 365-373.
45. Kraut H, Bhargava N (1964). Experiments on the isolation of the kallikrein inactivator. V. The isolation of a kallikrein inactivator from the bovine lung and its

- identification with the inhibitor from the bovine parotid gland. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 338: 231-237.
46. Anderer FA, Hornle S (1966). The disulfide linkages in kallikrein inactivator of bovine lung. J Biol Chem. 241: 1568-1572.
 47. Green D, Sanders J, Eiken M, Wong CA, Frederiksen J, Joob A, Palmer A, Trowbridge A, Woodruff B, Moerch M (1995). Recombinant aprotinin in coronary artery bypass graft operations. J Thorac Cardiovasc Surg.110: 963-970.
 48. David Royston D (2005). Mechanism of Action of Aprotinin. Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine 7: 29-36.
 49. Kassell B (1970). Bovine trypsin-kallikrein inhibitor (Kunitz inhibitor, basic pancreatic trypsin inhibitor, polyvalent inhibitor from bovine organs). Methods. Enzymol 19: 844-852.
 50. Helland R, Otlewski J, Sundheim O, Dadlez M, Smalas AO (1999). The crystal structures of the complexes between bovine beta-trypsin and ten P1 variants of BPTI. Journal of Molecular Biology 287: 923-942.
 51. Suna Z, Lub W, Jiangb A, Chena J, Tangb F, Liu (2009). Expression, purification and characterization of aprotinin and a human analogue of aprotinin. Protein Expression and Purification 65: 238-243.
 52. Lazdunski M, Vincent WP, Schweitz H, Peron Renner M, Pudles J (1974). Mechanism of association of trypsin (or chymotrypsin) with pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz and Kazal), kinetics and thermodynamics of interreaction. Proteinase Inhibitors (Ed: Fritz I). New York, 420-431.
 53. Kokoszka A, Kuflik P, Bitan F, Casden A, Neuwirth M (2005). Evidence-based review of the role of aprotinin in blood conservation during orthopaedic surgery. Journal of Bone and Joint Surgery 87: 1129-1136.
 54. Choi ES, Kim MK, Song MK, Kim JM, Kim ES, Chung WJ, Park KS, Cho KB, Hwang JS, Jang BK (2014). Association between serum irisin levels and non-alcoholic fatty liver disease in health screen examinees. Plos One: 0110680. doi: 10.1371/journal.pone.0110680.
 55. Timmons JA, Baar K, Davidsen PK, Atherton PJ (2012). Is irisin a human exercise gene. Nature 488: 9-10.

56. Spiegelman BM, Wrann C (2014). Response to comment on Wu and Spiegelman. Irisin ERKs the Fat. *Diabetes* 63: 381-383.
57. Cox B, Kislinger T, Emili A (2005). Integrating gene and protein expression data: pattern analysis and profile mining. *Methods* 35: 303-314.
58. Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ (2004). Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 3: 960-969.
59. Albrecht E, Norheim F, Thiede B, Holen T, Ohashi T, Schering L, Lee S, Brenmoehl J, Thomas S, Drevon CA, Erickson HP, Maak S (2015). Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. *Scientific Reports* 5: 8889. doi: 10.1038/srep08889.

9. EKLER

9.1. Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı: Aprotininli ve Aprotininsiz Serum ve Plazma Örneklerinde İrisin Seviyesinin Belirlenmesi

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

Çalışmanın Amacı Nedir?

İrisin yeni keşfedilen bir miyokindir. Bu nedenle literatürde irisine ilgili çalışmalar sınırlıdır, ancak, bu miyokinin metabolizma ile ilişkili birçok hastalıkta (obezite, T2DM, CVD...) önemli rolü olduğu yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur. Aprotinin, çok değerlikli bir serin proteaz inhibitörüdür. Ortama eklendiğinde (plazma ve serum örneklerine) serin proteaz enzimine bağlanarak, enzimi inhibe eder ve hedef proteinlerin parçalanmasını önleyerek, proteinin yarılanma süresini uzatır.

Laboratuvarımızda birkaç yıldır canlı materyallerinde irisine hormonu tayinleri yapılmaktadır. Bazen materyal örneklerinin toplanması uzun bir sürede gerçekleştiğinden, örneklerin bir süre derin dondurucuda saklanması gerekmektedir. Bu durumdan yola çıkarak, irisine seviyesinin belirlenmesinde plazma ve serum örneklerine proteaz inhibitörü olan aprotininin ilave edilmesinin gerekip, gerekmediği bu çalışma ile ortaya konulacaktır.

9.1. Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Devam)

Katılma Koşulları Nedir?

Yapılacak çalışmada gönüllülük esas alınarak yaklaşık 20 sağlıklı kişi (10 bayan, 10 erkek) çalışmaya dahil edilecektir. Bu kişilerden dörder tüp kan alınacak, seçilen kişilerin yaşları ve cinsiyetleri dikkate alınacaktır.

Nasıl Bir Uygulama Yapılacaktır?

Çalışmaya dahil edilecek sağlıklı kişilerden dörder tüp kan alınacaktır (2 biyokimya, 2 CBC). Kanların hepsinin seviyesinin aynı olmasına dikkat edilecek. Bir ml kana 0.6 TIU aprotinin olacak şekilde, tüpler için aprotinin miktarı hesaplanarak; bir biyokimya tüpüne 75 µL, bir CBC tüpüne 45 µL aprotinin ilave edilecektir, diğer tüplere ilave edilmeyecektir. Daha sonra numuneler 30 dakika içinde 3000 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüjlenecek, serum ve plazma örnekleri ayrılacaktır. Numuneler -80 derecede derin dondurucuda 3 ay saklanacaktır. Bu süre sonunda ticari ELISA kiti kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda plazma ve serum örneklerinde FNDC5/irisin düzeyleri ölçülecektir.

Sorumluluklarım Nedir?

Araştırma ile ilgili olarak hastanın herhangi bir sorumluluğu yoktur (örn. uygulama süresi boyunca hiçbir ilaç kullanmama ancak zorunlu olarak ilaç almak durumunda kalındığında mutlaka sorumlu araştırmacıyı bilgilendirme, uygulanan araştırma şemasına özen gösterme, araştırmacının önerilerine uyma vb.). Bu koşullara uymadığınız durumlarda araştırmacı sizi uygulama dışı bırakabilme yetkisine sahiptir.

Katılımcı Sayısı Nedir?

Araştırmaya 20 gönüllü sağlıklı birey katılacaktır.

Katılımım Ne Kadar Sürecektir?

Hastalar rutin hastalıklarının seyri sırasında bir kez kan vereceklerdir.

Çalışmaya Katılma İle Beklenen Olası Yarar Nedir?

Laboratuvarımızda birkaç yıldır canlı materyallerinde iris hormonu tavinleri yapılmaktadır. Bazen materyal örneklerinin toplanması uzun bir sürede

9.1. Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Devam)

gerçekleştiğinden, örneklerin bir süre derin dondurucuda saklanması gerekmektedir. Bu durumdan yola çıkarak, irisin seviyesinin belirlenmesinde kan ve serum örneklerine proteaz inhibitörü olan aprotininin ilave edilmesinin gerekip, gerekmediği bu çalışma ile ortaya konulacaktır. (örn, araştırmadan tıbbi olarak bir yarar sağlamasının söz konusu olmadığı ancak bu çalışmadan çıkarılan sonuçların başka insanların yararına

kullanılabilecek olması, yalnızca araştırma amaçlı olduğu ve doğrudan yarar görmesi ya da tedavinin seyrinin değiştirilmesinin beklenmeyeceği vb.)

Çalışmaya Katılma İle Beklenen Olası Riskler Nedir?

Hastanın rutin işlemleri için kan verme sırasında 6-8 mL ek kan verme dışında hiçbir ek işlem olmayıp, bununda hiçbir tıbbi riski yoktur.

Araştırma Sürecinde Birlikte Kullanılmasının Sakıncalı Olduğu Bilinen İlaçlar/Besinler Nelerdir?

Çalışma çerçevesinde böyle bir durum yoktur.

Hangi Koşullarda Araştırma Dışı Bırakılabilirim?

Çalışmaya alınacak sağlıklı kişilerden tek bir kan alınması nedeniyle böyle bir durum söz konusu değildir.

Diğer Tedaviler Nelerdir?

Yok.

Herhangi Bir Zararlanma Durumunda Yükümlülük/Sorumluluk Kimdedir ve Ne Yapılacaktır?

Hastaya herhangi bir zarar verilmesi mümkün değildir.

Araştırma Süresince Çıkabilecek Sorunlar İçin Kimi Aramalıyım?

Gönüllülerden bir seferde kan alınacak acil bir durum oluşmayacaktır.

Çalışma Kapsamındaki Giderler Karşılancak Mıdır?

Çalışmada böyle bir ödeme gerektiren parametre kullanılmamaktadır.

9.1. Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Devam)

Çalışmayı Destekleyen Kurum Var Mıdır?

Yok.

Çalışmaya Katılmam Nedeniyle Herhangi Bir Ödeme Yapılacak Mıdır?

Hayır.

Araştırmaya Katılmayı Kabul Etmemem veya Araştırmadan Ayrılmam Durumunda Ne Yapmam Gerekir?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Katılmama İlişkin Bilgiler Konusunda Gizlilik Sağlanabilecek Midir?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlanırsa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 5 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

9.1. Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Devam)

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

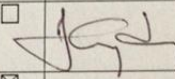
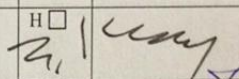
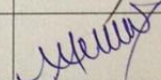
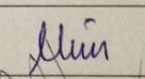
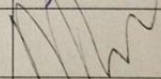
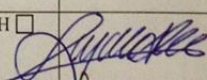
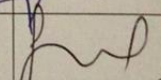
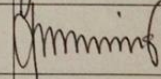
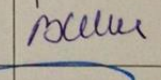
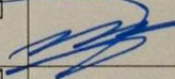
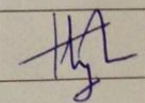
GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİ DIŞINDAN YETKİN BİR HEKİM		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		

GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

10. ETİK KURUL ONAYI

KTÜ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU									
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 8	Tarih: 23/02/2015							
	Prof.Dr.E.Edip KEHA'nın sorumluluğunda yürütülen Yük.Lis.Öğr.Ecem İMAMOĞLU'na ait "Aprotininli ve Aprotininsiz Serum ve Plazma Örneklerinde İrisin Seviyelerinin Belirlenmesi" başlıklı 2014/159 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.								
KTÜ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI KARAR FORMU									
ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Faruk AYDIN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLI
Prof.Dr.S.Caner KARAHAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr. Hafız AYDIN Üye:	Ortopedi ve Travmatoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Yüksel ALIYAZICIOĞLU Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLI
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Gülşay KARAGÜZEL Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLI
Doç.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr. Evrim ÖZKORUMAK Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Fatih Mehmet GÖKÇE Üye:	Fizyoloji	RTE Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Bahanur ÇEKİÇ Üye:	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Dilek MALKOÇ Üye:	Aile Hekimi	Sürmene Aile Sağlığı Merkezi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Miraç ÇELİK Üye:	Hukuk	KTÜ Hukuk Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLI
Tufan SAĞLAM Üye:	Tekstil	Serbest (Tekstil Mühendisi)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
* :Araştırma ile İlişki / ** :Toplantıda Bulunma									

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : İMAMOĞLU, Ecem

Uyruğu : T.C

Doğum tarihi ve yeri : 18/10/1989 Rize

Medeni hali : Bekar

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi- Fen Fakültesi, Kimya Bölümü	2013
Lise	Trabzon Fatih Lisesi	2007

YABANCI DİL

İngilizce