



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HOMOSİSTEİNİN NORMAL VE OBEZ
FARELERİN YAĞ DOKUSUNDA CD36 GEN
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Şeniz DOĞRAMACI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE

TRABZON-2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HOMOSİSTEİNİN NORMAL VE OBEZ
FARELERİN YAĞ DOKUSUNDA CD36 GEN
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Şeniz DOĞRAMACI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE

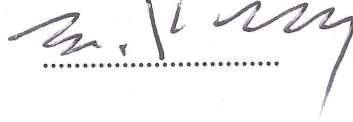
TRABZON-2016

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

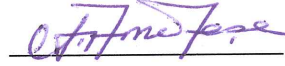
Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Şeniz DOĞRAMACI'nın hazırladığı **“Homosisteinin Normal ve Obez Farelerin Yağ Dokusunda CD36 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi”** 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 Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

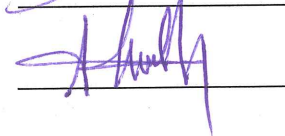
Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE



Prof. Dr. Ahmet ALVER



Prof. Dr. Hasan EFE



Tarih: 09/06/2016

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: 24.05.2016

Şeniz DOĞRAMACI

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 Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye,

Hem güzel ahlaki değerlerini hem de akademik başarılarını örnek aldığım Sayın Prof. Dr. E. Edip KEHA'ya,

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

Çalışmam sırasında yardımlarını benden esirgemeyen, destek ve katkıları ile her zaman yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Selim DEMİR'e, Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Diler US ALTAY'a, Doktora Öğr. İmran İNCE'ye,

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

Zor zamanlarımda beni yalnız bırakmayan çok değerli arkadaşım Arş. Gör. Neslihan SAĞLAM'a ve güzel kalpli ailesine; birlikte çalışmaktan zevk aldığım değerli arkadaşım Arş. Gör. Elif ŞAHİN'e,

Ruhuma huzur veren nice güzel dostlarıma ve canım aileme,

Ömrüm boyunca eksikliğini her zaman hissedeceğim canımdan öte, kalbimdeki tüm sevgilerin özü olan biricik anneme sonsuz teşekkür ederim.

Arş. Gör. Şeniz DOĞRAMACI

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin TSA-2015-5323 nolu projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Obezite	5
4.2. Yağ Dokusu	5
4.3. Homosistein ve Yapısı	7
4.3.1. Homosisteinin Hücre İçine Alınması ve Metabolizması	8
4.3.2. Plazma Homosistein Düzeyleri	9
4.4. CD36 Reseptörü	10
4.4.1. CD36 Reseptörünün Protein ve Gen Yapısı	10
4.4.2. CD36 Reseptörünün Biyolojik Önemi	12
4.5. Okside LDL	15
4.6. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör (PPAR)	16
4.7. CCAAT/ Enhancer Bağlayan Protein (C/EBP)	18
4.8. Real-time PCR	20
5. GEREÇ ve YÖNTEM	22
5.1. Gereç	22
5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri	22
5.1.2. Kullanılan Ticari Kitler ve Kimyasallar	23
5.2. Yöntem	23
5.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	23
5.2.2. Yağ Dokularından Total RNA İzolasyonu	25

5.2.3. RNA Örneklerinden cDNA Elde Edilmesi	26
5.2.4. Real-time PCR Protokolü	27
5.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	30
6. BULGULAR	31
6.1. Morfolojik Bulgular	31
6.2. Çalışma Gruplarının Kilo Artışı ve Son Ağırlık Ölçümü Sonuçları	32
6.3. Deney Gruplarının Epididimal Yağ Dokusundaki CD36, PPAR γ ve C/EBP α Gen Ekspresyon Sonuçları	32
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	38
8. KAYNAKLAR	47
9. ETİK KURUL ONAYI	54
10. ÖZGEÇMİŞ	55

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları	22
Tablo 2. Kullanılan kitler, kimyasallar ve üretici firmaları	23
Tablo 3. Fare yemlerinin kalori miktarları	24
Tablo 4. Deneyde kullanılan yemler ve içme suyu	24
Tablo 5. RNA örneklerinden cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri	27
Tablo 6. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri	28
Tablo 7. Real Time PCR analizi için gerekli reaksiyon bileşenleri	28
Tablo 8. RT-PCR Protokolü	29
Tablo 9. Deney gruplarının 15. gün sonu ve 3. ay sonu ağırlık sonuçları	32
Tablo 10. Deney gruplarının CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyon sonuçları	32
Tablo 11. Obez gruba göre Obez + Hcy grubunun CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyon sonuçları	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa	
Şekil 1.	Homosisteinden homosistin oluşumu	7
Şekil 2.	Total plazma homosistein bileşenleri ve oranları	8
Şekil 3.	CD36 geninin şematik gösterimi	10
Şekil 4.	CD36 reseptörünün hücre zarındaki gösterimi	11
Şekil 5.	CD36 reseptörü aracılığıyla okside LDL sinyal mekanizması	14
Şekil 6.	PPAR' lerin genel yapısı	16
Şekil 7.	Amplifikasyon eğrileri	30
Şekil 8.	Deney gruplarının CD36 gen ekspresyon analizi sonuçları	33
Şekil 9.	Deney gruplarının PPAR γ gen ekspresyon analizi sonuçları	34
Şekil 10.	Deney gruplarının C/EBP α gen ekspresyon analizi sonuçları	34
Şekil 11.	Obez gruba göre Obez +Hcy grubunun CD36 gen ekspresyon analizi sonucu	35
Şekil 12.	Obez gruba göre Obez +Hcy grubunun PPAR γ gen ekspresyon analizi sonucu	36
Şekil 13.	Obez gruba göre Obez +Hcy grubunun C/EBP α gen ekspresyon analizi sonucu	36
Şekil 14.	Obez fare epididimal yağ dokusunda CD36, PPAR γ , C/EBP α 'nın gen ekspresyonlarının muhtemel mekanizması	45
Şekil 15.	Obez fare epididimal yağ dokusunda CD36, PPAR γ ,C/EBP α 'nın gen ekspresyonu üzerine homosistein etkisinin muhtemel mekanizması	46

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Farelerin beslenme programı başlangıcındaki görüntüsü	31
Resim 2. Farelerin beslenme programı sonundaki görüntüsü	31



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AGE	İleri glikasyon son ürünleri
AdoHcy	S-adenozilhomosistein
AdoMet	S-adenozil metiyonin
aP2	Adiposit protein 2
BKİ	Beden kitle indeksi
bZIP	Basic-leucine zipper
Cb	Kobalamin
CBS	Sistationin beta sentaz
CD36	Cluster of differentiation 36
C/EBPα	CCAAT/Enhancer Bağlayıcı Protein
CLESH-1	CD36 LIMP II Emp Structural Homology-1
CTH	Sistationin gama liyaz
DEPC	Dietil prikarbonat
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
Hcy	Homosistein
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HODE	Hidroksioktadekadionik asit
IL	İnterlökin
JNK	Jun aminoterminal kinaz c-Jun aminoterminal kinase
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOX-1	Lektin benzeri okside LDL reseptörü-1
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure
MAT	Metiyonin adenziltransferaz
MCP-1	Monosit kemotaktik protein-1
M-CSF	Monocyte Colony-Stimulating Factor
MDA	Malondialdehit
MTRR	Metiyonin sentaz redüktaz
NF-κB	Nükleer faktör kapp B
NMDA	N-metil-D-aspartat

N5-MTHF	5-metiltetrahidrofolat
NR4A	Nükleer reseptör 4A
PAI-1	Plazminojen aktivator inhibitör 1
PGJ2	ProstaglandinJ2
PKC	Protein Kinaz C
PPAR	Peroksizom proliferatör aktive reseptör
PPRE	Peroksizom proliferatör response element
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RXR	Retinoid X reseptörü
SR	Scavenger reseptor
SREBP1c	Sterol regulatory element-binding protein 1
TAG	Triaçilglisol
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
TSP-1	Trombospondin-1

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ε	Epsilon
ζ	Zita
μ	Mikro

Formüller

C₃H₇OH	İzopropil alkol
C₂H₅OH	Etanol

1. ÖZET

Homosisteinin Normal ve Obez Farelerin Yağ Dokusunda CD36 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Obezite, vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olmasından kaynaklanan bir hastalıktır. Homosistein (Hcy), esansiyel bir aminoasit olan metiyoninin hücre içi demetilasyonu sırasında oluşan bir aminoasittir. Cluster of differentiation 36 (CD36), sınıf B çöpçü reseptör ailesinin bir üyesidir. Peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama (PPAR γ) ve CCAAT/Enhancer Bağlayıcı Protein (C/EBP α) adiposit fonksiyonu ile ilgili birçok geni aktive eden ve CD36'nın ekspresyonunu da düzenleyen transkripsiyon faktörleridirler. Bu çalışmada, hem normal hem de yüksek kalorili diyetle obezite modeli oluşturulan BALB/c farelerden elde edilen epididimal yağ dokusunda birçok patolojik olayla ilişkili olan Hcy'nin CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyonu üzerine etkisinin *in vivo* olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda, her birinde 6 adet fare bulunan 4 grup oluşturuldu: Grup 1: Standart fare yemi ve içme suyu, Grup 2: Yüksek yağ içerikli yem ve içme suyu, Grup 3: Standart fare yemi ve homosistein ihtiva eden içme suyu, Grup 4: Yüksek yağ içerikli yem ve homosistein ihtiva eden içme suyu. Her grup yukarıda belirtilen şekilde üç ay beslendikten sonra epididimal yağ dokusu örnekleri alındı. Yağ dokusu örneklerinde CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemiyle belirlendi. Obez farelerin yağ dokusunda CD36 gen ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı bulunurken ($p=0.003$), Hcy'nin hem standart fare yemi hem de yüksek yağlı yem ile beslenen farelerin yağ dokusunda CD36 gen ekspresyonunu Hcy verilmeyen farelerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı bulundu (sırasıyla $p=0.002$ ve $p=0.002$). PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyon düzeylerinin ise standart fare yemi ile beslenen gruba göre diğer tüm gruplarda anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). Ayrıca Hcy takviyesi ile hem PPAR γ hem de C/EBP α gen ekspresyon seviyelerinin kendi kontrollerine göre düşük seviyelerde seyrettiği izlendi. Sonuç olarak hiperhomosisteineminin kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü oluşunda olası etkenlerden birinin de Hcy'nin yağ dokusunda CD36 gen ekspresyonunu azaltması olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: CD36, C/EBP α , Homosistein, Kardiyovasküler Hastalık, Obezite, PPAR γ

2. SUMMARY

Examination of the Effect of Homocysteine on CD36 Gene Expressions in the Adipose Tissue of Normal and Obese Mice

Obesity is a disease deriving from energy in the body absorbed with foods exceeding energy expended. Homocysteine (Hcy) is an amino acid that forms during intracellular demethylation of the essential amino acid methionine. Cluster of differentiation 36 (CD36) is a member of the class B scavenger receptor family. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α) are transcription factors that activate several genes associated with adipocyte function and that also regulate the expression of CD36. The purpose of this study was to examine, in vivo, the effect of Hcy, associated with several pathological events, on CD36, PPAR γ and C/EBP α gene expression in epididymal adipose tissue obtained from BALB/c mice with an obesity model induced with a high-calorie diet. Four groups, each containing six mice, were established in our study: Group 1: Standard chow and drinking water, Group 2: High fat content chow and drinking water, Group 3: Standard chow and drinking water with added Hcy, Group 4: High fat content chow and drinking water with added Hcy. Epididymal adipose tissue specimens were collected after mice in each group had been fed as described above for 3 months. CD36, PPAR- γ and C/EBP α gene expression levels in adipose tissue specimens were determined using the RT-PCR method. CD36 gene expression increased significantly in adipose tissue from obese mice ($p=0.003$), while Hcy statistically significantly reduced CD 36 gene expression in mice receiving both standard chow and high-fat chow compared to mice that were not given Hcy ($p=0.002$ and $p=0.002$, respectively). PPAR- γ and C/EBP α gene expression levels decreased significantly in all groups compared to the group receiving standard chow ($p<0.05$). Additionally, with Hcy supplementation both PPAR γ and C/EBP α gene expression levels proceeded at lower levels compared to their own controls. In conclusion, one of the possible factor for hyperhomocysteinemia to be an independent risk factor in cardiovascular diseases can be attributed to reduction of CD36 gene expression by Hcy in adipose tissue.

Key Words: Cardiovascular Disease, CD36, C/EBP α , Homocysteine, Obesity, PPAR γ

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Obezite, vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olmasından kaynaklanan ve vücut yağ kitlesinin artması ile karakterize, hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenen bir hastalıktır (1). Obezitenin diyabet, üreme ve gastrointestinal sistem bozuklukları, hipertansiyon, artrit, uyku apnesi, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi patolojiler için risk faktörü olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (2).

Homosistein (2-amino-4-merkaptobütirik asit) (Hcy) sülfür içeren esansiyel olmayan bir aminoasittir ve metiyoninin hücre içi demetilasyonu sırasında oluşmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar Hcy'nin yağlı karaciğer hastalığı, hipertansiyon, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğunu bildirmektedir (3).

Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL); kolesterol, kolesterol esteri, triaçilgliserol ve fosfolipit içeren bir lipoproteindir. LDL'nin yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri serbest radikal hasarına karşı oldukça duyarlı olup, artmış oksidatif stress sonucu okside LDL oluşumu da artmaktadır (4). Dolaşımdaki okside LDL seviyesinin ateroskleroz, tip 2 diyabet ve obezite gibi kronik hastalıklarda arttığı bildirilmektedir (5).

Sınıf B çöpçü reseptör ailesinin bir üyesi olan cluster of differentiation 36 (CD36), omurgalı hayvanlarda birçok hücrenin yüzeyinde bulunan bir transmembran glikoproteindir (6, 7). CD36'nın; monositlerde, makrofajlarda, plateletlerde, kapiller endotel hücrelerinde ve adipositlerde okside LDL'nin ve uzun zincirli yağ asitlerinin alınmasında görev aldığı gösterilmiştir (4, 8). *In vitro* koşullarda, Hcy'nin LDL oksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Diyetle alınan Hcy dolaşımdaki okside LDL seviyesini artırarak aterosklerotik lezyonların oluşumunu tetikler ve artan okside LDL, CD36 ekspresyonunu düzenler (9).

Perokizom proliferator aktive reseptör gama (PPAR γ) tip II nükleer reseptör ailesinin bir üyesi olup, adiposit farklılaşması, lipid metabolizması ve glukoz homeostazında yer alan çok sayıda hedef genin ekspresyonunun regülasyonuna katılmaktadır (10). Ayrıca, CD36 gen ekspresyonunun da önemli bir düzenleyicisidir (Şekil 14, 11-13).

CCAAT/enhancer bağlayıcı proteinler (C/EBP) C terminallerinde dimerizasyon ve DNA bağlanma bölgesi bulunduran iyi korunmuş bir temel lōsin fermuar (bZIP) yapısı içeren transkripsiyon faktörleri ailesine aittir. C/EBP α hem adipogenez hem de normal

adiposit farklılaşması için gereklidir. Çeşitli fibroblast hücre dizilerinde C/EBP α 'nın ektopik ekspresyonu adipogenezi sağlamaktadır. Ayrıca, C/EBP α ; PPAR γ ekspresyonuna sebep olarak adipogenezi uyarmaktadır (Şekil 14) (14). Hiperhomosisteinemi kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (15).

Adipositler hiperkolesterolemik koşullar altında CD36 aracılığıyla dolaşımdan okside LDL'leri almakta ve okside LDL'lerin kandaki seviyelerini azaltmaktadırlar. Bu özelliğinden dolayı adipoz doku dolaşımdaki kolesterol için bir "tampon havuzu (buffering pool)" olarak düşünülmektedir. Bu durum çoğu araştırmacı tarafından adipositlerin aterosklerozun tedavisinde potansiyel bir hedef olarak görülmesine neden olmuştur (4). Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışmada, birçok patolojik olayla ilişkili olan Hcy'nin hem normal hem de yüksek kalorili diyetle obezite modeli oluşturulan BALB/c farelerden elde edilen epididimal yağ dokularında CD36 ve CD36 ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri PPAR γ ve C/EBP α 'nın gen ekspresyonu üzerine etkisinin *in vivo* olarak incelenmesi amaçlandı.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Obezite

Obezite, vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olmasından kaynaklanan ve vücut yağ kitlesinin artması ile karakterize, hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenen bir hastalıktır (1). Obezitenin oluşmasında; yaş, cinsiyet, sosyo-kültürel faktörler, hormonal ve metabolik etkenler, sigara kullanımı, aşırı alkol tüketimi, bazı ilaçlar ve yetersiz uyku gibi faktörlerin etkili olduğu bildirilmektedir. Bazı endokrin ve psikiyatrik hastalıkların yanı sıra günümüzde fiziksel aktivitenin azalması ve kalori içeriği yüksek besinlerin aşırı tüketilmesinin obezitenin yaygınlaşmasına sebep olduğu vurgulanmaktadır (16). Obezite, vücut ağırlığının (kg), boy uzunluğunun karesine (m^2) oranıyla tanımlanır ve bu değer beden kitle indeksi (BKİ) olarak adlandırılmaktadır (17). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) obezite tanısında erkekler için $BKİ > 30$, kadınlar için $BKİ > 28.6$ olarak kullanılmasını önermektedir ve $BKİ \geq 25 \text{ kg/m}^2$ üzeri olan bireyler aşırı kilolu, 30 kg/m^2 'nin üzerinde olan bireyler ise obez olarak standardize edilmiştir (18). Obezitenin diyabet, üreme bozuklukları, gastrointestinal sistem bozuklukları, hipertansiyon, artrit, uyku apnesi, kalp hastalıkları ve kanser gibi patolojiler için risk faktörü olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (2). Obezite sıklığı hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde her geçen yıl artış göstermektedir. Obezitenin dünya çapında yaygınlığı ise 1980-2014 yılları arasında iki kattan fazla artmıştır (18). Son yirmi yılda obezitenin yaygınlığı yetişkinlerde iki katına; çocuklarda ise üç katına çıkmıştır (2).

4.2. Yağ Dokusu

Yağ dokusu, etrafı kan damarları, immün hücreler, kollajen lifleri ve fibroblastlar ile çevrili gevşek bağ dokusudur. Yağ dokusu adiposit hücrelerinden oluşmaktadır. Adipositler yağ dokusunda ya tek başına ya da küçük gruplar halinde bulunabilirler. İnsanlarda yağ dokusu farklı fonksiyonlarına göre beyaz (uniloküler) ve kahverengi (multiloküler) yağ dokusu olmak üzere ikiye ayrılır. Beyaz yağ dokusu tek ve büyük bir lipid damlası içeren tek damlacıklı hücre tipinden oluşmaktadır (19, 20). Lipid damlacıkları kolesterol, fosfolipid, yağ asitleri, triaçilgliserol (TAG) ve nötral yağların karışımını içerir. Yaklaşık olarak depolanan toplam lipid içeriğinin % 95'i genelde palmitik asit ve oleik asitten oluşan TAG'dir. Geriye kalan ise diaçilgliserol, fosfolipit, esterleşmemiş yağ asidi ve kolesterolü oluşturmaktadır (21). Lipid damlacığı herhangi bir

hücre içi organel içermemektedir. Kahverengi yağ dokusu ise çok damlacıklı hücrelerden oluşmaktadır. Beyaz ve kahverengi yağ dokusu içerdikleri damar ve mitokondri miktarından dolayı renklerinde farklılık gözlenmektedir. Ayrıca, kahverengi yağ dokusu zengin bir damar ağına sahiptir (20). Beyaz yağ dokusu enerjinin TAG şeklinde depolandığı yerdir. Enerji deposu olmasının yanı sıra vücutta başka görevleri de vardır. Özellikle deri altı yağ dokusu vücut yüzeyinin şekillenmesinde rol oynar. Isı geçirgenliği az olduğu için vücudun ısı yalıtımını ve dokular arasındaki boşlukları doldurarak bazı organların yerinin korunmasını sağlar. Kahverengi yağ dokusu ise enerji tüketiminde özelleşmiştir ve insanlarda özellikle yeni doğanlarda ısı dengesinin düzenlenmesinde etkilidir (19, 22).

Yağ dokusu anatomik yerleşimlerine göre subkutan ve visseral yağ dokusu olarak sınıflandırılmaktadır. İnsan vücudundaki yağ dokusunun yaklaşık % 80'i yüzeysel ve derin subkutan yağ dokusudur. Subkutan yağ dokusu boyun, sırt, bel, karın, femoral ve meme bölgesinde bulunur. Yağ dokusunun yaklaşık % 20'si visseral yağ olarak mide, bağırsak, pankreas, aort, kalp, böbrek ve iç üreme organları çevresinde bulunmaktadır. Ayrıca kas içinde ve çevresinde az miktarda bulunan yağ dokusu da visseral yağ dokusuna dahil edilmektedir (21).

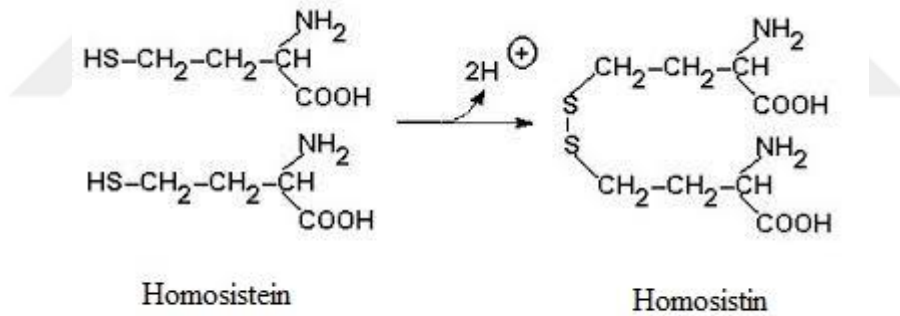
Yağ dokusu bir endokrin doku gibi davranarak enerji dengesinin ayarlanmasında, nöroendokrin ve immün fonksiyonların düzenlenmesinde aktif rol alan proteinleri salgılar. Adipoz doku adipokinler olarak adlandırılan biyoaktif peptidlerin sentezlendiği ve salgılandığı yerdir. Adipoz doku, enerji metabolizmasını düzenleyen fizyolojik ve patolojik süreçlerin bir kısmında aktif rol oynamaktadır. Ayrıca yağ dokusu enerji metabolizması, immün sistem ve üreme sistemi üzerine etkisi olan faktörleri de salgılar. Bu salgı maddelerinin bazıları, leptin, adiponektin, rezistin, interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8), interlökin-10 (IL-10) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α)'dır. Bu faktörlerin dolaşıma geçişi hormonal sinyallerle kontrol edilir. Yağ hücrelerinin fonksiyonu dışarıdan gelen insülin, adrenalin, noradrenalin ve kortizon gibi hormonlar ve sitokinler aracılığı ile endokrin, parakrin ve otokrin sinyaller aracılığıyla düzenlenir. Yağ hücresi membranında ve sitoplazmasında farklı hormon ve sitokinlere ait reseptörler bulunur. Yağ hücresi membranında bulunan reseptörler; leptin, insülin, tiroid uyarıcı hormon, anjiyotensin II gibi hormon sitokin reseptörleri, α_1 , α_2 , β_1 ve β_2 reseptör gibi adrenerjik reseptörleri, lipoprotein reseptörleri (çok düşük yoğunluklu lipoprotein, düşük yoğunluklu lipoprotein,

yüksek yoğunluklu lipoprotein gibi), okside LDL çöpçü reseptörü (CD36 gibi) ve sitoplazmada bulunan nükleer reseptörleridir. Bu reseptörlerin uyarılması ile oluşan sinyaller, hücre fonksiyonlarını uyararak veya inhibe ederek düzenlerler (23). Bu nedenle adipositler obezite, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar için potansiyel terapötik hedef olarak gösterilmektedir (24).

4.3. Homosistein ve Yapısı

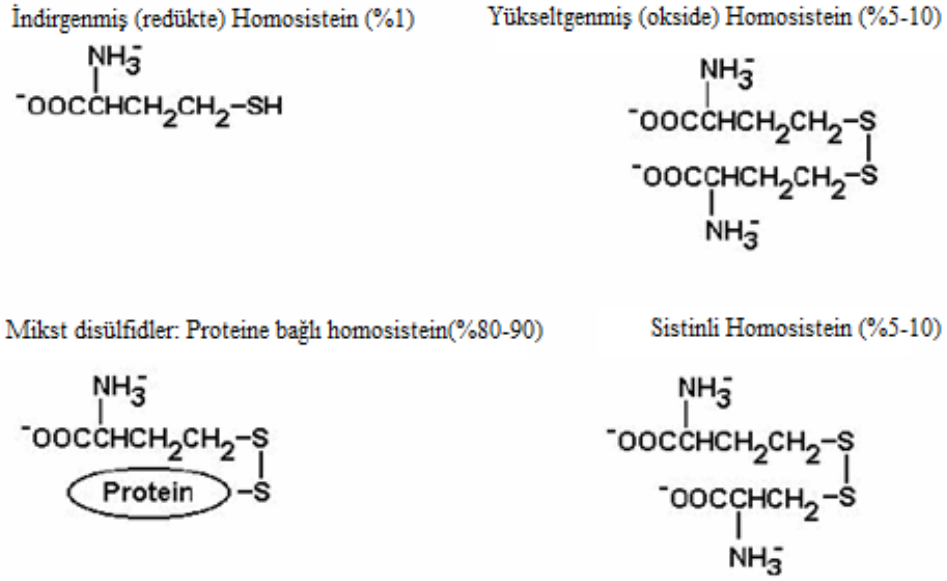
Homosistein sülfür içeren esansiyel olmayan bir aminoasittir ve metiyoninin hücre içi demetilasyonu sırasında oluşmaktadır. İnsan plazmasında homosisteinin, yaklaşık % 1'i serbest tiyol, % 70-80'i özellikle albümin gibi plazma proteinlerine disülfid bağları ile bağlı şekilde, geriye kalan % 20-30'u ise oksitlenerek dimerler veya sisteinle birleşerek karışık disülfidler şeklinde bulunur. İnsan plazmasında homosistein hem yükseltgenmiş formda hem de indirgenmiş formda serbest veya proteine bağlı olarak bulunur (3).

Homosistein miktarı artınca oksidasyonla homosistine dönüşümü Şekil 1' de verilmiştir.



Şekil 1. Homosisteinden homosistin oluşumu (Menteşe' den, 4)

Total plazma homosistein bileşenleri ve yüzdeleri aşağıdaki Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Total plazma homosistein bileşenleri ve oranları (Menteşe'den, 4)

Hcy metabolizmasının hücre içinde sıkı bir şekilde düzenlenmesi önemlidir. Çünkü Hcy, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin agonisti olması, oksidatif strese neden olması, metilasyon kapasitesini azaltması, nörotoksik amiloid peptidin hücre içinde ve dışında birikimine neden olması, endoplazmik retikulum stresine sebep olması ve hücrede programlanmış hücre ölümünü aktive etmesi gibi birçok olaya neden olabilmektedir. Bu nedenle Hcy oluşuktan sonra remetilasyon ve transsülfürasyon yollarıyla metabolize edilerek toksik etkisinden korunulmaya çalışılır (25-28).

4.3.1. Homosisteinin Hücre İçine Alınması ve Metabolizması

Homosisteinin hücre içine alınmasıyla ilgili mekanizmalar tam açıklanamamakla beraber sisteinin de taşınmasında görev alan taşıma sistemleri üzerinde durulmaktadır. Homosisteinin hücre içine alınmasında rol oynayan Na-bağımlı glutamat ve aspartat taşıyıcısı (X_{AG}), alanin, serin, sistein taşıyıcısı (ASC) ve alanin taşıyıcısı (A) sistemleri ile Na-bağımsız büyük dallı zincirli amino asitler (L) transport sistemleri yapılan hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir. Ayrıca nötral amino asitler homosistein transportunu inhibe etmektedir (29).

Homosistein metabolizması başlıca karaciğerde meydana gelmektedir. Homosistein metabolizması iki yolu içerir: folat ve vitamin B12'nin gerekli olduğu metiyoninin yeniden metilasyonu ve vitamin B6'nın gerekli olduğu sistationun transsülfürasyonudur.

Metiyonin adenziltransferaz (MAT) metiyonin ve ATP'den S-adenozil metiyonin (AdoMet) biyosentezini kataliz eder. MAT iki genle kodlanır. MAT1A, MATI/III'ü kodlar ve sadece karaciğerde eksprese edilir. MAT2A'yı eksprese eden MATII neredeyse tüm dokularda bulunur. AdoMet DNA, RNA, protein ve nörotransmitterlere bir metil grubu verir. 100'den fazla metiltransferaz bulunabilir. Bu reaksiyonların her biri çoğu metiltransferazları inhibe eden S-adenozilhomosistein (AdoHcy) üretir. AdoHcy hidrolaz (SAAH) AdoHcy'ni adenzin ve homosisteine hidroliz eder. SAAH'ın dengesi AdoHcy oluşumunu tercih ettiği için, hem Hcy hem de adenzin metabolize olmayan veya AdoHcy birikimini önlemek için hücrelere taşınmasına ihtiyaç duyar.

Homosistein remetilasyonu metiyonin sentaz (MTR) enzim katalizi ile olmakta ve homosistein metabolizması ile folat döngüsü birbirine bağlanmaktadır. Metiyonin sentaz fonksiyonu için kofaktör olarak kobalamin (CbI) gerekir ve CbI(I)MTR kompleksi oluşur. MetilCbI(III)MTR oluşması için 5-metiltetrahidrofolat (N^5 -MTHF)'nin metil grubuna bağlanır. Homosisteine metil grubunun transfer edildiğinde, CbI(I)MTR yeniden oluşur ve 5-metilTHF (tetrahidrofolat)'da diğer metil grubunu kabul edebilir. Cb(II)alamin CbI(II)MTR kompleksini inaktive ederek Cb(II)alamine okside olabilir. Metiyonin sentaz redüktaz (MTRR) bir metil vericisi olan AdoMet'i kullanarak CbI(II)MTR kompleksini yeniden oluşturur. MTR enzimi aynı zamanda eksprese olurken, diğer homosistein remetilasyon sistemi başlıca karaciğer ve böbreklerde eksprese edilir.

Transsülfürasyon yolunda, Hcy geri dönüşümsüz olarak sisteine indirgenir. Transsülfürasyon vitamin B6-bağımlı iki enzimle işlev görür: sistationin beta sentaz (CBS) ve sistationin gama liyaz (CTH). CBS, homosistein ve serinin kondensasyonu ile sistationine kataliz eder ve CTH sırasıyla sistationinin sisteine ve alfa-ketoglutarata hidrolizini katalizler. CBS, karaciğer, böbrek, kas, beyin ve ovaryumda eksprese edilir (30).

4.3.2. Plazma Homosistein Düzeyleri

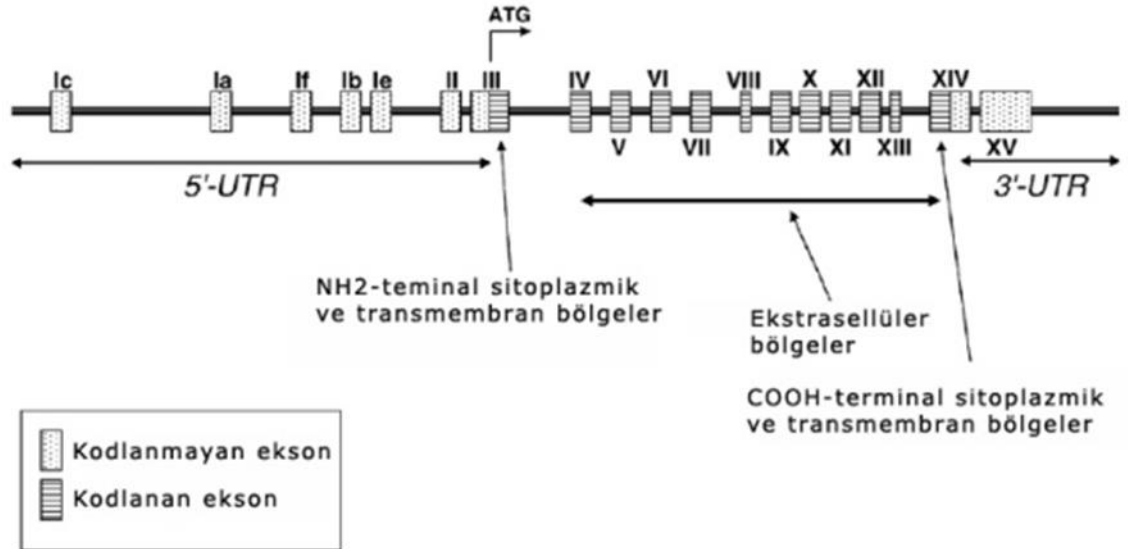
Homosistein seviyelerinin ölçümü, ilk defa 1962 yılında homosistinürlü hastaların araştırılmasında tanı için kullanılmıştır (31). Hcy'nin vasküler hastalık oluşturduğuna dair ilk bulgu 1969 yılında McCully tarafından homosistinürlü iki çocukta otopsi sonucunu değerlendirirken yaygın arteriyel tromboz ve ateroskleroz saptanması ile gösterilmiştir. Hcy düzeyleri genel olarak total serum homosisteini veya total plazma homosisteini olarak

ölçülmektedir. Bu ölçüm serbest ve proteine bağlı kısmı içermektedir. Plazma Hcy düzeyi genellikle 5-15 $\mu\text{mol/L}$ normal olarak 16 $\mu\text{mol/L}$ üzerindeki düzeyler ises hiperhomosisteinemi olarak kabul edilmektedir. Plazma Hcy değerleri 16-30 $\mu\text{mol/L}$ arasında ise hafif hiperhomosisteinemi, 31-100 $\mu\text{mol/L}$ arasında ise orta hiperhomosisteinemi, >100 $\mu\text{mol/L}$ ise ciddi hiperhomosisteinemi olarak değerlendirilir (32).

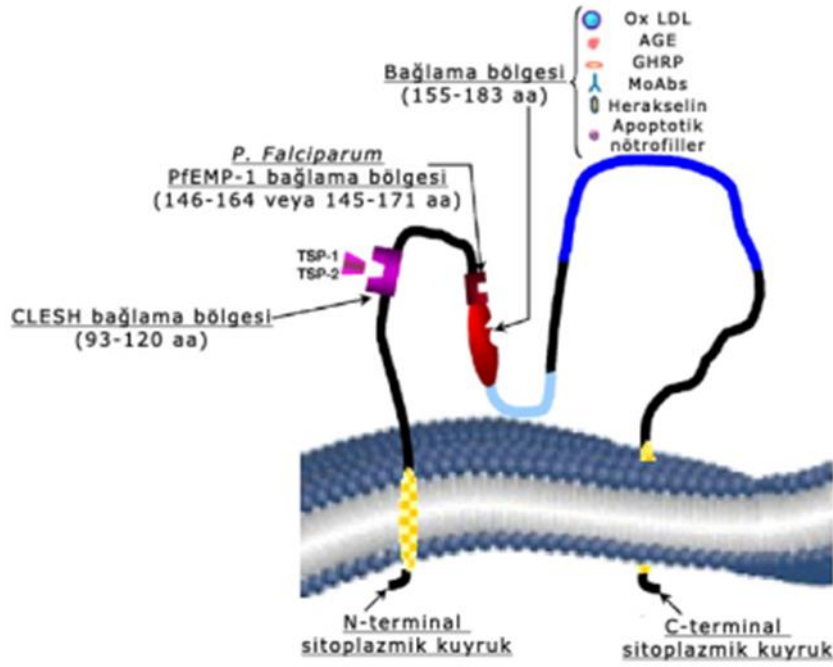
4.4. CD36 Reseptörü

4.4.1. CD 36 Reseptörünün Protein ve Gen Yapısı

CD36, birçok hücre yüzeyinde bulunan 88 kDa molekül ağırlığına sahip bir transmembran glikoproteindir. CD36 monositler, makrofajlar, trombositler, mikrovasküler endotel hücreleri, adipositler, böbrek ve kalp miyositlerindeki epitel hücrelerinden eksprese edilir. CD36 çöpçü reseptör B1 ve lizozomal integral membran protein 2'yi içeren sınıf B çöpçü reseptör ailesine aittir. CD36 geni, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda q11.2 bölgesinde, sıçanlarda 4. kromozom ve farelerde 5. kromozomda yerleşmiştir (Şekil 3). CD36 proteini 472 amino asitten oluşan tek bir peptid zincirinden ibarettir ve iki tane çok kısa sitoplazmik domain ve büyük glikozillenmiş ekstrasellüler domain olmak üzere iki transmembran domainden oluşur (Şekil 4).



Şekil 3. CD 36 geninin şematik gösterimi (Menteşe'den,4)



Şekil 4. CD 36 reseptörünün hücre zarındaki gösterimi (Menteşe'den,4)

CD36; trombospondin-1, okside fosfolipidler, okside LDL, hekzarelin, fibriler beta amiloid peptidler ve uzun zincirli yağ asitlerini bağlar. CD36 ayrıca *Plasmodium falciparum* enfekte edilmiş eritrositleri, *Staphylococcus* ve *Mycobacterium*'un bakteriyel hücre duvarı bileşenlerini, hücre kökenli mikropartükülleri ve apoptotik hücreleri de bağlamaktadır. Her ligandın bağlanma bölgesi farklıdır. Trombospondin-1; 93-155 amino asit arasında yer alan CLESH-1 (CD36 LIMP II Emp Structural Homology-1) domainine bağlanır. Okside fosfolipidin bağlanma bölgesi 157-171 amino asit arasında yerleşiktir ve okside LDL'nin bağlanma bölgesinde 155-183 sırasına yakındır. Endotel CD36'ya bağlanan trombospondin-1 apoptoza yol açarak anjiyogenezi inhibe eder. Bir yağ asidi taşıyıcısı olarak CD36, uzun zincirli yağ asitlerini bağlar ve hücre içerisinde taşınmasını sağlar. CD36'nın bu fonksiyonu miyositlerin beta-oksidasyonu ve adipositler de lipid deposu için gereklidir.

Köçük hücre oluşumu ateroskleroz için başlangıç aşamasıdır. Aterojenik süreç makrofajların farklılaştığı arteriyel intima kanda dolaşan monositlerin transmigasyonu ile başlar. Makrofajlar CD36 aracılığıyla okside LDL'yi bağlar. Okside LDL, nükleer hormon reseptörü PPAR γ ligandları gibi özel okside lipidleri taşır ve CD36

ekspresyonunu upregüle eder. Böylece okside LDL'nin alınımı kolaylaşır. Aktive makrofajlar LDL oksidasyonunu uyaran miyeloperoksidaz gibi oksidanları salgılar ve böylece okside LDL havuzu genişler. CD36 ve okside LDL arasındaki etkileşim sitokinlerin salgılanmasına sebep olur. CD36 geni çıkarılmış farelerde makrofajların okside LDL'yi alımı yetersizdir ve yüksek yağlı diyetle beslenen ApoE eksik veya LDL-reseptörü eksik farelerde az miktarda aterosklerotik lezyon oluştuğu görülmüştür (33).

CD36'nın ekstrasellüler bölgesi N-bağlı glikozilasyon bölgelerince zengindir ve 184-204 amino asitleri arasında lokalize olan hidrofobik bir bölge taşımaktadır. 242-333 amino asitleri arasında lokalize olan prolince zengin bölge içermektedir. 155-183 amino asitler arasında lokalize olan domaine ilerlemiş glikozilasyon son ürünleri (advanced glycated products, AGE), büyüme hormonu salgılayıcı peptidler olan heksarelin ve EP80317 bağlanır (34).

4.4.2. CD36 Reseptörünün Biyolojik Önemi

CD36, başlangıçta bir trombosit zar proteini ve trombospondin-1 (TSP-1) reseptörü olarak tanımlanmıştır. Daha sonra sırasıyla, makrofajlarda okside LDL ve apoptotik hücrelerin alınmasında, gram pozitif bakteri hücrelerinin komponentlerine karşı immün cevabın başlamasında görevli bir makrofaj reseptörü, mikrogliyalarda fibriler amiloid proteinlerin tanınması ve adipositlerde uzun zincirli yağ asitlerinin taşınmasında görev alan bir reseptör olarak tanımlanmıştır.

CD36 reseptörü, monositler/makrofajlar, trombositler, mikrovasküler endotel hücreler, adipositler, keratinositler, kardiyak ve iskelet kası hücreleri, retikülositler, mikrogliya, dendritik hücreler, meme, bağırsak ve retinal pigment endotel hücreleri, böbrek epiteli, çok az miktarlarda karaciğer ve düz kas hücreleri gibi oldukça çeşitli hücre ve doku tarafından sentez edilmektedir.

CD36 reseptörü, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kronik böbrek hastalığı, kanser biyolojisi, parazitoloji, Alzheimer hastalığı, inme, lipit metabolizması ve yağ asiti taşınması, adezyon, anjiyogenez, trombosit biyolojisi, kas fonksiyonu ve metabolizması, ateroskleroz, inflamasyonun düzenlenmesi, dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β)'nin aktivasyonu gibi bir çok önemli role sahiptir.

Endemann ve arkadaşları, CD36 aktarılmış insan epiteliyal böbrek hücreleri ile yaptıkları çalışmalarda, CD36'nın özgül olarak okside LDL bağlama kapasitesini ilk defa

ortaya koyarak CD36' nın bir okside lipoprotein reseptörü olduğunu göstermişlerdir (8). CD36 aracılığıyla makrofajlar tarafından okside LDL'nin alınması, insanlarda ateroskleroza yol açan köpük hücre farklılaşmasının başlangıcı ve gelişiminin önemli bir basamağıdır. CD36 gen polimorfizmi bulunan hastalardan izole edilmiş monosit/makrofajlarda okside LDL bağlanmasının ve birikiminin kontrol hücrelerine göre % 40 oranında azaldığı saptanmıştır. Okside LDL'nin CD36'ya bağlanması ve hücre içine alınmasını bloke eden özgül bir monoklonal antikor olan OKM5 kullanılarak yapılan çalışmada, okside LDL'nin makrofajlara bağlanmasının %50 oranında azaldığı gösterilmiştir. CD36 knockout yapılmış sıçan peritoneal makrofajlarında, okside LDL bağlanmasında bir azalma olduğu gözlenmiştir. CD36'nın C-terminalinde yer alan 6 amino asidin okside LDL nin reseptöre bağlanmasını ve metabolizmasını düzenlendiği gösterilmiştir.

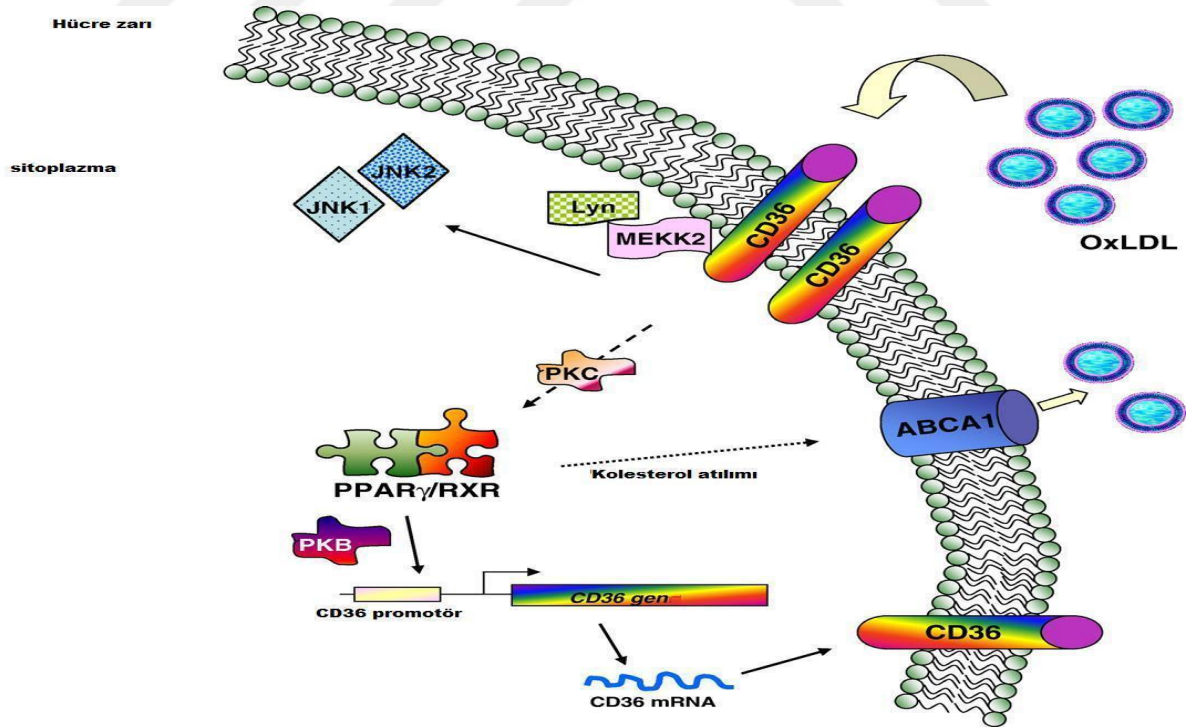
Monosit ve makrofajlarda CD36 ekspresyonu adezyon, farklılaşma, nükleer hormon reseptörleri ve sitokinler tarafından düzenlenmektedir. CD36 ekspresyonunun M-CSF(Monocyte Colony-Stimulating Factor), GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor), doğal ve modifiye LDL'ler, hücrel kolesterol ve IL-4 tarafından transkripsiyonel seviyede düzenlendiği gösterilmiştir. Kortikosteroidler; TGF- β , HDL ve CD36 ekspresyonunu baskılamaktadır.

CD36'nın iki kısa sitoplazmik bölgesi olmasına rağmen bir sinyal molekülü olduğu açıkça görülmektedir. Makrofajlarda CD36 reseptörüne okside LDL bağlanması ile Src protein tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan Lyn kinaz aktifleşir. Lyn kinaz aktivasyonu MEKK2 ve ardından JNK (Jun aminoterminal kinaz "c-Jun aminoterminal kinase") aktivasyonuna neden olarak proaterojenik okside LDL'nin fagositozuna yol açmaktadır (Şekil 5). Deneysel modellerde JNK'nın farmakolojik inhibisyonunda veya makrofajlarda JNK'ya spesifik olan bir delesyonda okside LDL alınımının ve aterosklerozun azaldığı bildirilmiştir.

CD36'nın bir sitokin olan IL-4'e ve okside LDL'ye cevap olarak ortak sinyal olan Protein Kinaz C (PKC) ve PPAR γ yolu ile upregüle olduğu gösterilmiştir (Şekil 5). CD36 ekspresyonunun önemli bir düzenleyicisi, nükleer hormon reseptörü olan PPAR γ 'dır. Okside LDL'nin CD36 tarafından hücre içine alınması sonucunda PPAR γ ligandları olan lipid yan ürünleri (9- ve 13-hidroksioktadekadionik asit (HODE), prostaglandinJ2 (PGJ2))

oluşan bu ligandlar PPAR γ 'yı aktive ederek CD36 ekspresyonunu arttırmırlar. TGF- α tarafından PPAR γ 'nın fosforilasyonu ve transkripsiyonel aktivitesinin inhibisyonu sonucunda CD36 mRNA ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Bir çalışmada fare makrofaj hücrelerinde CD36 mRNA ekspresyonunun, PKC vasıtasıyla uyarılan transkripsiyon faktörü PPAR γ aracılığıyla düzenlendiğini göstermişlerdir. Makrofaj hücrelerinde PKC aktivatörleri olan diaçilgliserol ve ingenol sayesinde CD36 mRNA ekspresyonunun düzenlendiği gösterilmiştir. PKC inhibitörleri PPAR γ mRNA ve protein ekspresyonunu azaltırken aynı zamanda CD36 protein ekspresyonunu bloke etmektedir.

Makrofajlar/monositler tarafından okside LDL'lerin biriktirilmesindeki rolüne ek olarak CD36, uzun zincirli yağ asitleri için bir zar reseptörü/taşıyıcısı fonksiyonuna sahiptir. CD36, apoptotik hücrelerin alınmasında görevli bir transmembran reseptörüdür. CD36 aynı zamanda, lipidce zengin besinlerin seçiminde uzun zincirli yağ asitlerinin algılayıcısı gibi önemli bir rol oynamaktadır. Bir çalışmada, tat tomurcuk hücrelerinde CD36'nın apikal ekspresyonu bildirilmiştir (4).



Şekil 5. CD36 reseptörü aracılığıyla okside LDL sinyal mekanizması (Menteşe'den,4)

4.5. Okside LDL

LDL, kolesterol, kolesterol esteri, TAG ve fosfolipit içeren bir lipoproteindir. Dış tabakasında B-100 apolipoproteini bulunmaktadır. LDL, bakır ve demir gibi geçiş metallerinin varlığında *in vitro* koşullarda oksidatif olarak modifiye olabilmektedir. LDL'nin yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri serbest radikal hasarı ve oksidasyona karşı çeşitli antioksidanlarla korunmaktadır. Bu antioksidanlar başlıca α -tokoferol, karotenoidler, kritoksantin, ubikinol-10 ve gama-tokoferoldür.

Okside LDL oluşumunun en erken safhası içeriğindeki uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonudur. LDL'nin yapısında bulunan uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) gibi reaktif lipid oksidasyon ürünleri oluşturmaktadır. Bu ürünler daha sonra proteinlerin lizin kalıntılarıyla etkileşmektedir.

Lipoproteinlerin modifikasyonlara uğraması aterosklerotik lezyon gelişimini hızlandırdığı, proinflamatuvar sitokinlerin salınımını indüklediği, vazodilatasyonu azalttığı ve endotel hücrelerde toksisiteye neden olduğu bilinmektedir. LDL'nin oksidasyonu monositler, makrofajlar, nötrofiller, endotel hücreleri, fibroblastlar ve düz kas hücrelerinde oluşabilmektedir.

Arterial intimanın ekstraselüler matriksinde LDL'nin oksidasyonu meydana gelmektedir. Oluşan bu ürünler makrofajlarda bulunan çöpçü reseptörler ile hücre içine alınmaktadır. Makrofajlar, LDL için de reseptör taşırlar. Doğal LDL'ler makrofajlara genellikle bağlanamazken, özellikle okside LDL makrofaj içine alınarak köpük hücrelerini oluşturur. Bundan dolayı sadece modifiye LDL'ler makrofajlar tarafından doğal LDL'den 8-10 kat daha hızlı alınabilmektedir. Bu modifiye LDL'ler makrofajlarda LDL reseptörlerinden farklı olarak CD36, 'çöpçü' reseptör AI, AII, AIII (SR-AI, SR-AII, SR-AIII), SR-BI, macrophage receptor with collagenous structure (MARCO), lektin benzeri okside LDL reseptörü (LOX-1) ve asetil LDL reseptörleri gibi farklı reseptörler tarafından alınırlar.

Okside LDL, sitotoksisiteyi indükler, TNF salınımını inhibe eder, monosit/makrofajlardan IL-1 β salınımını stimüle eder. Arter duvarında IL-1'in salınımını uyarak aterogenezi artırabilmektedir. Endotel hücreleri ve makrofajları uyarak monosit

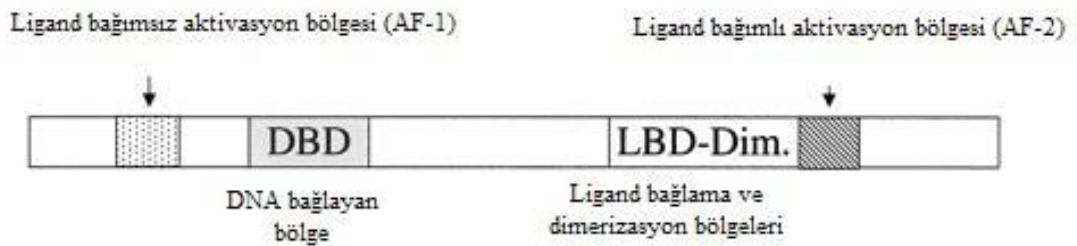
kemotaktik protein-1 (MCP-1) ve makrofaj koloni-stimüle edici faktör (MCSF) sentezini indükler. Endotel hücrelerde adezyon moleküllerinin ekspresyonuna yol açar (4).

4.6. Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör (PPAR)

1990'da Issemann ve Green tarafından, fare karaciğerinde steroid hormon reseptör ailesinin bir üyesi olarak PPAR tanımlanmıştır. PPAR'ler, retinoik asit reseptörleri, tiroid hormon reseptörleri ve steroid reseptörleri gibi nükleer reseptör süper ailesine ait transkripsiyon faktörleridir. Bu reseptörler lipid metabolizması, glukoz homeostazı, hücre çoğalması ve farklılaşması, inflamatuvar cevabın kontrolünde önemli bir role sahiptir. Steroid reseptörlerine benzemeyen, PPAR'ler, farmasötik ilaçlardan çoklu doymamış yağ asitleri, bazı prostaglandin türevleri ve eikosanoidleri içeren endojen moleküllere kadar çeşitlilik gösterebilir. Bu yüzden, PPAR'ler lipid metabolizmasını içeren genlerin ekspresyonunu düzenleyen başlıca transkripsiyon faktörleridir.

Homodimer oluşturarak etki gösteren steroid hormon reseptörlerinin aksine, PPAR'ler retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturur. RXR'nin 3 izoformu bulunur ve hepsi de endojen agonist 9-cis retinoik asitle aktive olur. PPAR-RXR kompleksi nükleus içine geçer ve peroksizom proliferatör response element (PPRE) ile bağlanarak etkisini gösterir. PPRE, tek nükleotid aralıkla AGGTCA sekansına sahip 2 hekzanükleotidden oluşan bir yapıdır. Bu veya buna benzer bir sekans PPAR'lerin uyardığı birçok gende bulunmuştur.

PPAR'ler diğer nükleer reseptörler gibi fonksiyonel bölgelerden oluşmuş yapılara sahiptir. PPAR'lerin üç boyutlu yapısı N-ucunda DNA bağlama domaini ve C-ucunda ligand bağlama domainini içerir. Reseptörün C-terminal bölgesinde bulunan ligand bağlama domaini, 13 tane α -sarmal ve 4 tane β -tabakadan oluşmaktadır. Bu da, PPAR'lerin yapısal olarak farklı doğal ve sentetik ligandlarla etkileşmesine izin vermektedir (Şekil 6).



Şekil 6. PPAR'lerin genel yapısı (Türker'den, 35)

PPAR ailesi kendine özgü doku dağılımı, ligand özgüllüğüne ve fizyolojik fonksiyonlarına göre üç izoformdan oluşmuştur. Bunlar; PPAR α , PPAR β/δ ve PPAR γ 'dır. Yapılar birbirine çok benzerlik gösterse de farklı biyolojik fonksiyonlara sahiptirler. PPAR α ; karaciğer, böbrek, kalp, iskelet kası ve kahverengi yağ dokusunda eksprese edilmektedir. PPAR α , yağ asitlerinin β -oksidasyonu ve alınımından, peroksizom çoğalması ve adiposit farklılaşmasından sorumludur ve ayrıca çeşitli hücre tiplerinde anti-inflamatuvar etki gösterir. PPAR β , beyin, makrofaj, akciğer, adipoz doku ve iskelet kasında eksprese edilmektedir. PPAR β 'nın biyolojik fonksiyonları ve ligandları tam olarak bilinmemesine rağmen son zamanlarda makrofajlarda kolesterol trafiğinin düzenlenmesinde ve HDL metabolizmasında rol oynadığı gösterilmiştir. PPAR γ , adipoz doku, kalın bağırsak ve hematopoetik hücrelerde fazla miktarda eksprese olurken; böbrek, karaciğer ve ince bağırsakta az miktarda eksprese olmaktadır. Ayrıca, PPAR γ nadiren kaslarda da bulunabilir. Nükleusta lokalize olan PPAR γ , proteini 505 amino asitten oluşur ve 57.6 kDa molekül ağırlığına sahiptir.

PPAR γ , nükleer reseptörlere yapısal özellikleri bakımından benzerlik gösterirler ve ligand bağımsız transkripsiyon aktivasyon fonksiyonunu (AF-1) taşıyan N-terminal A/B bölgesi, DNA bağlayan bölge, ligand bağımlı aktivasyon fonksiyonu (AF-2) gösteren ligand bağlayıcı üç kısımdan oluşmaktadır.

İnsanlarda, PPAR γ 'nın PPAR γ 1, PPAR γ 2 ve PPAR γ 3 olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. PPAR γ 1 ve PPAR γ 3 aynı protein ürünü oluşturmalarına rağmen PPAR γ 2 amino ucunda ilaveten 28 amino asit içermektedir. PPAR izoformları arasındaki fonksiyonel farklılıklar tam olarak açıklanamamıştır. PPAR ekspresyonu dokuya göre değişim göstermektedir. PPAR γ 1 çeşitli dokularda bulunmasına rağmen PPAR γ 2 adipoz dokuda bulunmaktadır. PPAR γ 3 makrofajlarda, kalın bağırsak ve beyaz adipoz dokuda bolca bulunmaktadır. PPAR γ 2 adiposit farklılaşmasını düzenlemede daha baskın bir role sahiptir.

Beslenme ve metabolik süreçler sonucunda ortaya çıkan çoklu doymamış yağ asitleri ve eikosanoidler PPAR γ 'ın endojen ligandları iken tiazolidindionlar ve non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlar ise sentetik ligandlarıdır.

PPAR γ , pre-adiposit farklılaşmasında, adipositlerde lipogenezi oluşturma, insülin direncini arttırma ve inflamatuvar cevabın baskılanmasında önemli rollere sahiptir. PPAR γ

adipoz hücre farklılaşması, glukoz homeostazı ile lipid depolanmasında görev alır ve bu olaylarla ilgili birçok genin transkripsiyonunu kontrol eder. Ayrıca bu reseptör insülin duyarlılığı ve lipoprotein metabolizmasına da katılabilir. PPAR γ 'ın hedef genleri arasında açıl-CoA oksidaz, açıl-CoA sentaz, adiposit tip yağ asidi taşıyıcı protein, fosfoenol piruvat karboksikinaz, malik enzim, CD36, C/EBP α , leptin, resistin, lipoprotein lipaz ve adiponektin gösterilebilir (36-38).

4.7. CCAAT/Enhancer Bağlayan Protein (C/EBP)

CCAAT/enhancer bağlayıcı proteinler C terminallerinde dimerizasyon ve DNA bağlanma bölgesi bulunduran iyi korunmuş bir temel lösün fermuar (bZIP) yapısı içeren transkripsiyon faktörleri ailesine aittir. Prototipik C/EBP proteini, bir aktivasyon bölgesi, bir dimerizasyon bZIP bölgesi ve bir DNA bağlanma bölgesi içermektedir. DNA bağlanması için dimerizasyon bölgesi gereklidir.

İlk C/EBP proteini Steve Mcknight'ın laboratuvarında, sıçan karaciğerinden, ısıya karşı kararlı bir faktör olarak tanımlanmıştır. C/EBP transkripsiyon faktörleri DNA'da bulunan çeşitli genlerin "*promotör*" bölgelerinde yer alan CCAAT motifini ve bazı viral "*enhancer*" larda bulunan "*core homology*" bölgesini tanıdığı için bu ismi almıştır.

C/EBP geni 1988'de klonlanmıştır (39). C/EBP ailesinin altı üyesinin genleri bugüne kadar birçok farklı laboratuvar tarafından birçok türde klonlanmış ve farklı isimler verilmiştir. Bunlar; C/EBP α , β , γ , δ , ϵ , ζ 'dir. C/EBP α , β , γ ve δ genleri intronsuz iken ϵ ve ζ iki ve dört adet ekson içermektedir. Tüm C/EBP izoformları C terminallerinde 55-65 aminoasitlik bZIP yapısı barındıran bir sekans benzerliğine sahiptir. bZIP yapısındaki lösün fermuarı bir alfa helikal yapı oluşturduğu düşünülen dört ya da beş lösün barındıran heptad tekrarından oluşmaktadır. Bu iki tekrar paralel bir şekilde etkileşerek "*coiled-coil*" yapısını oluşturmaktadır. Bu yapı dimerizasyonun yapılmasını sağlamaktadır. Temel yapı lösün fermuar yapısıyla sürekli bir bağlantı halindedir ve bu yapıdaki aminoasitler DNA bağlanmasını sağlamaktadır.

C/EBP α mRNA'sından N-terminallerindeki aminoasit sekanslarında farklılıklar bulunan iki önemli protein olan C/EBP-42 kD ve C/EBP-30 kD üretilmektedir. Hücre proliferasyonunu inhibe eden C/EBP-42'nin aksine C/EBP-30 antimitotik değildir. Dolayısıyla C/EBP α 'nın 12 kD'luk N-terminalindeki sekansı antimitotik aktivite için

gereklidir. Adiposit farklılaşmasında ve hepatosit gelişiminde hücrel C/EBP-42 / C/EBP-30 oranı değişmektedir ve bunun düzenleyici bir etkisinin olduğu düşünülmektedir.

C/EBP α adipoz doku, karaciğer, bağırsak, akciğer, adrenal bez, periferel kan mononükleer hücreleri ve plasentada yüksek düzeyde sentez edilmektedir.

C/EBP α 'nın daha çok farklılaşma sürecinde rol aldığı, proliferasyon sürecini inhibe ettiği düşünülmektedir. C/EBP α , farklılaşmasını tamamlamış adipositlerde yüksek düzeylerde eksprese edilmekte ve proliferasyon sırasında ekspresyonu azalmaktadır. C/EBP α 'nın ekspresyonu olgun hepatositlerde fazla iken karaciğer rejenerasyonu sırasında azalmaktadır. C/EBP α hem adipogenez hem de normal adiposit farklılaşması için gereklidir. Çeşitli fibroblast hücre dizilerinde C/EBP α 'nın ektopik ekspresyonu adipogenezi sağlar. Ayrıca, C/EBP α PPAR γ ekspresyonuna sebep olarak adipogenezi sağlamaktadır (40).

4.8. Real-time PCR

Real-time PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu), DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir. Bilim ve tıp alanındaki çalışmalarda, nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniğin real-time PCR olduğu ortaya konulmuştur. Bu teknik 80'li yılların ortasında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen PCR'ın ileri bir versiyonudur. Klasik PCR ile çok karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini, çok sayıda döngüsel işlemle istenilen miktarda çoğaltmak mümkündür. Ancak bu işlem tek başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamamakla birlikte, işlem sonrasında da ürün miktarını net olarak belirlemek oldukça güç hale gelmektedir. Çünkü klasik PCR başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız bir ürün miktarını ortaya çıkarmaktadır. Higuchi ve arkadaşları 1992 yılında real-time PCR'ı geliştirmişlerdir. Real-time PCR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süresi boyunca oluşan ürünün miktarını real-time PCR sırasında gözlemek mümkün olmuştur. Amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi real-time PCR'yi özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinde tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkan reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü floresans işaretli probalar ile sağlanmaktadır (41).

Son zamanlarda bilimsel araştırmalar için kullanılan gen ekspresyon çalışmalarında kantitatif real-time PCR yöntemi altın standart olarak kabul edilmekte ve gen ekspresyon seviyeleri hassas bir şekilde belirlenebilmektedir. Real-time PCR ile elde edilen veriler mutlak kantitasyon (absolute quantification) veya göreceli kantitasyon (relative quantification) analiz teknikleri ile değerlendirilmektedir. mRNA ekspresyon çalışmalarında ise sıklıkla göreceli kantitasyon kullanılmaktadır. Bu teknikte aynı örneğe ait iki farklı hedef genin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılır ve sonuç bu hedeflerin oranı olarak ifade edilir. Karşılaştırma amacıyla kullanılan ikinci gen ekspresyonu "referans gen" olarak isimlendirilir ve tüm deney şartlarında değişmez miktarda eksprese olduğu kabul edilir. Bu referans gen internal kontrol olarak da bilinir ve örnekten örneğe olan farklılıkların değişiminin normalizasyonu için kullanılır. İlgilenilen genin deney gruplarının ekspresyon seviyeleri muamelesiz grup (negatif kontrol) ekspresyon seviyeleri başlangıç alınarak rölatif olarak ifade edilir. Böylelikle rölatif kantitasyon kullanıcılara, bir

hedef genin en az iki farklı durumdaki ekspresyon profilini kolayca karşılaştırmalarına olanak sağlar. Rölatif kantifikasyon gen ekspresyonunun belirlenmesinde en iyi teknik olarak kabul edilmektedir (42).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemelerinin listesi üretici firmaları ile birlikte Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları

Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri	Üretici Firma
Derin Dondurucu (-80°C)	Thermo Electron Corporation
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S
Real-Time PCR cihazı	Roche LightCycler 480 II
Mikrosantrifüj	Thermo IEC Micromax
Otomatik pipetler	Socorex, Isolab, Eppendorf
Saf Su Arıtma Cihazı	Kros
Santrifüj	Eppendorf, Centrifuge 5810
Soğutmalı santrifüj	Beckman-Coulter
PCR cihazı	Applied Biosystems GeneAmp9700
Vorteks	IKA Vortex, Genius 3
Otoklav	Tuttnauer 3150 ELV
Mikro hacimli spektrofotometre	Thermo Nanodrop 2000
Çalkalayıcılı inkübatör	ShellLab/Sheldon S14-2
El homojenizatörü	OMNI-Tissue Master 125

5.1.2. Kullanılan Ticari Kitler ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kitler ve kimyasallar üretici firmaları ile birlikte Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan kitler, kimyasallar ve üretici firmaları

Kullanılan kitler ve kimyasallar	Üretici Firma
TRI pure RNA İzolasyon Reaktifi	Roche - Cat. No 94006620
Transcriptor First Strand cDNA synthesis kiti	Roche - Cat. No 12055620
Real time ready CD36 Assay, UPL probe	Roche Assay Id. 311921
Real time ready PPAR γ Assay, UPL probe	Roche Assay Id. 310239
Real time ready C/EBP α Assay, UPL probe	Roche Assay Id. 313484
Real time ready β -aktin Assay, UPL probe	Roche Assay Id. 300236
RT-PCR reaksiyon ortamı kiti	Roche, 04707494001
Dietil prikarbonat (DEPC)	Sigma
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	Sigma
İzopropil alkol (C ₃ H ₇ OH)	Sigma
Kloroform	Sigma
Fare Yemi	Research Diet (D12492, D12450J)

5.2. Yöntem

Çalışmamızda Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinden temin edilen 24 adet 20-25 g ağırlığındaki BALB/c erkek fareler kullanıldı.

5.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda kullanılan fareler, KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezinden temin edilip yine aynı yerde deneyler için 12 saatlik karanlık-aydınlık ortam sağlanarak barındırılıp beslendi.

Fareler, ticari olarak Research Diet firmasından satın alınan yemlerle beslendi.

Farelerin kullanmış olduğu yemlerden sağlanan yaklaşık kalori miktarları Tablo 3’te verildi.

Tablo 3. Fare yemlerinin kalori miktarları

	Protein (% kcal)	Karbohidrat (% kcal)	Yağ (% kcal)
D12492	20	20 (%7 sukroz)	60
D12450J	20	70 (%7 sukroz)	10

Öncelikle farelerin tümü 15 gün süreyle standart fare yemi (D12450J) ile alınan kalorisinin % 70'ini karbohidrattan, % 20'sini proteinden, % 10'unu yağdan sağlayacak şekilde beslendi. Yem ve su *ad libitum* olarak verildi. 15 gün sonra fareler rastgele her grupta 6 adet fare olacak şekilde 4 gruba ayrıldı ve farelerin tartım işlemleri gerçekleştirildi. Oluşturulan bu gruplara 3 ay süreyle Tablo 4'te belirtilen şekilde yem ve içme suyu verildi. Normal+Hcy ve obez+Hcy gruplarının içme sularına günlük 0.9 g/L olacak şekilde Hcy ilave edildi.

Tablo 4. Deneyde kullanılan yemler ve içme suyu

Gruplar	Standart fare yemi ile beslendi (D12450J)	Yüksek yağ içerikli yemle beslendi (D12492)	İçme suyuna 0.9 g/L homosistein ilave edildi
I. Grup	+		
II. Grup		+	
III. Grup	+		+
IV. Grup		+	+

Fareler ilgili yemlerle üç ay beslendikten sonra tekrar tartılarak kiloları kaydedildi. Deney süresinin sonunda, tüm farelerin dekapitasyonunun ardından epididimal yağ dokuları alındı. Tüm dokular ölçüm yapılana kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı.

5.2.2. Yağ Dokularından Total RNA İzolasyonu

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

%75'lik Etanol Çözeltisi: % 99.8'lik etanolden 75.15 mL alınarak saf su ile hacmi 100 mL'ye tamamlandı.

Dietilpirokarbonat (DEPC)'li Çözelti: 100mL'lik DEPC'den, % 0.1 (v/v)'lik 500mL olacak şekilde DEPC'li su hazırlanarak 2 saat boyunca 37°C inkübe edildi ve inkübasyonun ardından 15-20 dk boyunca otoklavlandı. Işıktan etkilenmesini önlemek için koyu şişelerde saklandı.

RNA izolasyonu TRİpure total RNA izolasyon reaktifi kullanılarak yapıldı. İzolasyon prosedürü modifiye edilerek sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı:

1. 50-100 mg arasında tartılan yağ dokuları, RNAaz ve DNAaz'sız polipropilen endopdorflara konulduktan sonra üzerine 1 mL TRİpure izolasyon reaktifi eklendi.
2. Örnekler el homojenizatörü ile 6000 rpm'de 30 saniye homojenize edildi.
3. Homojenize edilen numuneler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. 12000 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üç faz oluştu.
5. Tüplerin üst kısmında oluşan beyaz tabaka atıldı. Ardından aynı tüpün dibine dokunmadan ortadaki faz yeni bir tüpe alındı.
6. Üzerine 200 µL kloroform ilave edildi ve çalkalandı.
7. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. 12000 g'de 15 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
9. Oluşan iki fazın üst kısmı yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine eşit miktarda (500 µL) izopropil alkol ilave edildi (alt faz atıldı).
10. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
11. 12000 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edildi.
12. Süpernatant tamamen atıldı.
13. Pellet üzerine 1 mL % 75'lik etanol ilave edildi ve vortekslenerek çözünmesi sağlandı.
14. 7500 g'de 5 dk +4 °C'de santrifüj edildi.

15. Süpernatant tamamen atıldı.

16. Etanolün uzaklaştırılması için ependorflar kapakları açık tutularak 10 dk süreyle 40-50 °C’de etüvde inkübe edildi.

17. Elde edilen RNA’ların üzerine 50 µL DEPC’li su eklendi ve 10 dk 55 °C’de inkübe edildi.

18. Daha sonra nanodrop kullanılarak RNA konsantrasyonları ve A260/280 oranı (RNA saflığı) ölçüldü.

Elde edilen RNA’nın saflığı 260/280 absorbanans oranı olarak belirlendikten sonra cDNA dönüşümü yapılabilmek için -80 °C’de saklandı. Daha sonra Reverse Transkriptaz ile cDNA elde edildi.

5.2.3. RNA Örneklerinden cDNA Elde Edilmesi

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA eldesi ticari kit kullanılarak üretici firmanın yönlendirmeleri doğrultusunda aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

1. -80 °C’de saklanan RNA örnekleri oda sıcaklığında erimeleri için bekletildi. Eriyen RNA örneklerinin homojenliğini sağlamak için bu örnekler ısı bloğu üzerinde 65 °C’de 10 dakika ısıtıldı.

2. RNA konsantrasyonları ölçülerek kaydedildi. Elde edilen en düşük RNA konsantrasyonu baz alınarak diğer RNA örnekleri bu konsantrasyona gelecek şekilde DEPC’li suyla seyreltilti.

3. 1.5 mL hacimli steril tüp içerisinde gerekli reaksiyon ortamı Tablo 5’de verilen hacimler kullanılarak hazırlandı.

4. Hazırlanan karışım cDNA elde edilecek her bir örnek için önceden hazırlanmış 250 µL hacimli tüplere her birinde 10’ar µL olacak şekilde dağıtıldı. Dağıtılan karışımlar üzerine de her bir deney grubu için 10’ar µL eşitlenmiş konsantrasyondaki RNA örneklerinden ilave edildi.

Tablo 5. RNA örneklerinden cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri

Reaktifler	Her bir örnek için gerekli hacim (µL)
Anchored-oligo dT primer	1
Random hexamer primer	2
Transkriptör reaksiyon tamponu	4
RNase inhibitörü	0.5
dNTP karışımı	2
Reverse Transkriptaz	0.5

- PCR cihazı; 10 dakika 25 °C

60 dakika 50 °C

5 dakika 85 °C olacak şekilde ayarlandı ve cDNA sentezi işlemi başlatıldı.

- Süre sonunda sentezlenen cDNA konsantrasyonları spektrofotometrik olarak ölçüldü, gruplar arası farkları ortadan kaldırmak adına cDNA konsantrasyonları eşitlendi ve RT-PCR aşamasına geçildi.

5.2.4. Real Time PCR Protokolü

Gen ekspresyon çalışmaları; ekspresyonu ölçülmek istenen hedef gen için spesifik olarak üretilen UPL (Universal Probe Library) probolar kullanılarak üretici firmanın yönlendirmeleri doğrultusunda Roche Light Cycler 480 II marka cihaz kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullandığımız primerler Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. RT-PCR’da kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Primer dizisi
β -Aktin	İleri primer 5'- GGATGCAGAAGGAGATTACTGC -3'
	Geri primer 5'- CCACCGATCCACACAGAGTA -3'
CD36	İleri primer 5'-GCGACATGATTAATGGCACA -3'
	Geri primer 5'-CAATGTCCGAGACTTTTCAACA -3'
PPAR γ	İleri primer 5'-AAGACAACGGACAAATCACCA -3'
	Geri primer 5'-GGGGGTGATATGTTTGAAGTTG -3'
C/EBP α	İleri primer 5'-CCCAGAGGACCAATGAAATG -3'
	Geri primer 5'-ATACACCCTTGGACAAGTAGGG -3'

RT-PCR analizi için aşağıdaki adımlar takip edildi:

1. 1.5 mL hacimli tüp içerisinde hedef gen ve referans gen için ayrı ayrı olmak üzere gerekli reaksiyon ortamı Tablo 7’de verilen hacimler kullanılarak hazırlandı.

Tablo 7. Real Time PCR analizi için gerekli reaksiyon bileşenleri

Reaktif	Her bir örnek için gerekli hacim (μ L)
LightCycler 480 Probes master	10
Real time ready assay (<i>CD36</i> , <i>PPARγ</i> , <i>C/EBPα</i> ya da β -Aktin)	1
PCR saflığında su	4

2. Hazırlanan karışım her bir örnek için üç kuyucuk olacak şekilde RT-PCR için özel olarak üretilmiş beyaz 96 kuyucuklu pleyte her bir kuyucukta 15'er μ L olacak şekilde dağıtıldı. Dağıtılan karışımlar üzerine de her bir deney grubu için 5'er μ L cDNA örneği ilave edildi.

3. Cihaz ayarları Tablo 8’de verilen şablona göre düzenlendi ve RT-PCR analizi gerçekleştirildi.

4. Sonuçların analizi Roche Light Cycler 480-II cihazında bulunan Advance Relative Quantification programı ile yapıldı. Göreceli kantitasyon modunda; ilgilenilen hedef genler deney gruplarının ekspresyon seviyeleri muamelesiz grup (negatif kontrol) ekspresyon seviyeleri başlangıç alınarak göreceli olarak ifade edildi. Ayrıca homosistein verilen obez grupta ilgilenilen hedef genlerin ekspresyon seviyeleri, obez grubun ekspresyon seviyeleri başlangıç alınarak göreceli olarak ifade edildi.

Tablo 8. RT-PCR protokolü

Tespit formatı: Tek Renkli Hidroliz Prob/ UPL Probe

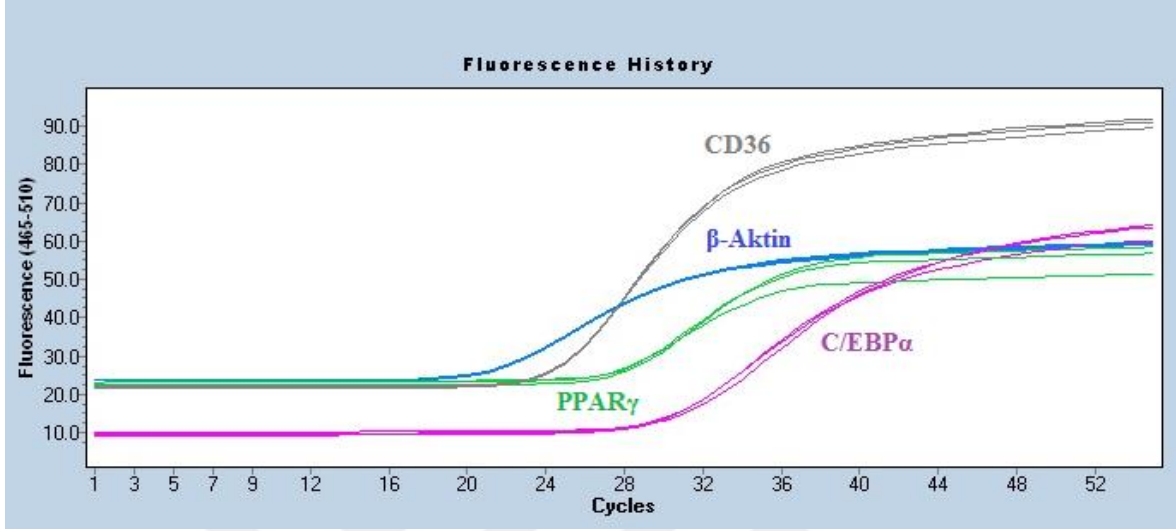
Pleyt türü: 96 kuyucuklu

Reaksiyon hacmi: 20 µL

Program	Döngü	Analiz Modu
Ön inkübasyon	1	-
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon
Soğutma	1	-

Hedef Sıcaklık °C	Elde etme modu	Süre	Sıcaklık artış hızı (°C/s)
Ön inkübasyon			
95	-	10 dakika	4.4
Amplifikasyon			
95	-	10 saniye	4.4
60	-	30 saniye	2.2
72	Tek	1 saniye	4.4
Soğutma			
40	-	30 saniye	2.2

RT-PCR çalışmasında beta-aktin, CD36, PPAR γ , C/EBP α 'a ait amplifikasyon grafiği Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Amplifikasyon eğrileri

5.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Her bir gruba ait değerler aritmetik ortalama ve standart sapma ($X \pm SD$) olarak ifade edildi. Denek sayısı her bir grupta ($n=6$) az olduğu için non-parametrik testler uygulandı. Bağımsız grupların değerlendirilmesinde Kruskal Wallis testi kullanıldı. Grup içindeki posthoc değerlendirmeler için Mann-Whitney U testi uygulandı. Bağımlı ikili testlerin karşılaştırılmasında ise Wilcoxon testi kullanıldı. $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

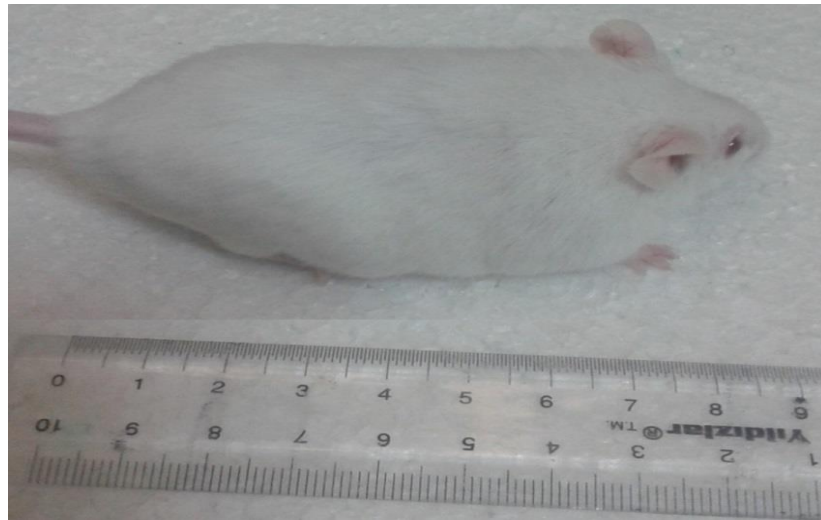
6. BULGULAR

6.1. Morfolojik Bulgular

Farelerin beslenme programı başlangıcındaki ve sonundaki görüntüleri Resim 1 ve 2’de görülmektedir.



Resim 1. Farelerin beslenme programı başlangıcındaki görüntüsü



Resim 2. Farelerin beslenme programı sonundaki görüntüsü

6.2. Çalışma Gruplarının Kilo Artışı ve Son Ağırlık Ölçümü Sonuçları

Çalışmamızda uyguladığımız beslenme periyodu sonucu ağırlık değişimleri Tablo 9'da verildi.

Tablo 9. Deney gruplarının 15. gün sonu ve 3. ay sonu ağırlık sonuçları

Gruplar	15. gün sonu ağırlığı (g)	3. ay sonu ağırlık (g)	p
Normal	26.8 ± 1.08	47.0 ± 2.02	0.028
Obez	26.6 ± 1.25	62.8 ± 5.51	0.028
Normal + Hcy	27.1 ± 1.05	51.8 ± 3.76	0.028
Obez +Hcy	26.1 ± 1.21	62.0 ± 2.37	0.028

p, “Wilcoxon testi” ne göre verilmiştir.

Beslenme programı sonunda, 15. gün sonu ağırlıklarına göre her bir grupta istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p < 0.05$). Ayrıca deney sonunda, obez ve obez+Hcy gruplarının, kilo artışının normal grup ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (sırasıyla $p = 0.002$, $p = 0.002$). Ancak Hcy takviyesi hem normal hem de obez gruplardaki farelerin kilolarında kendi kontrollerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadı ($p > 0.05$).

6.3. Deney Gruplarının Epididimal Yağ Dokusundaki CD36, PPAR γ ve C/EBP α Gen Ekspresyon Sonuçları

Epididimal yağ dokularındaki CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyonu sonuçları, normal gruba göre kıyaslanarak her bir grubun değerleri Tablo 10 ve Şekil 8, 9,10'da gösterildi.

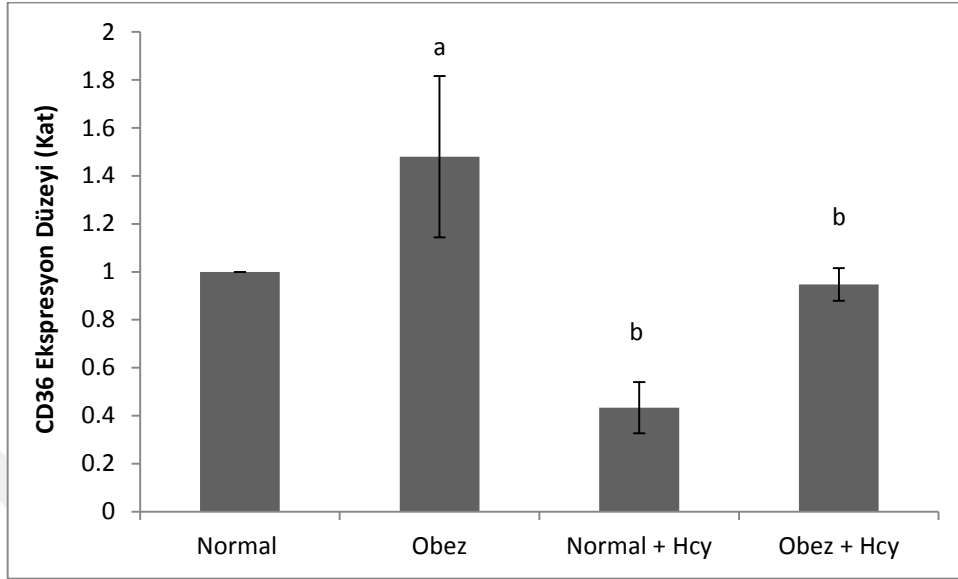
Tablo 10. Deney gruplarının CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyon sonuçları

Parametreler	Normal	Obez	Normal + Hcy	Obez + Hcy	p
CD36	1 ± 0	1.48 ± 0.336 ^a	0.434 ± 0.107 ^b	0.947 ± 0.068 ^b	0.000
PPAR γ	1 ± 0	0.486 ± 0.194 ^a	0.863 ± 0.064 ^a	0.380 ± 0.164 ^a	0.000
C/EBP α	1 ± 0	0.644 ± 0.227 ^a	0.757 ± 0.235 ^a	0.514 ± 0.176 ^a	0.006

p, “Kruskal Wallis testi” ne göre verilmiştir. Grup içindeki posthoc değerlendirmeler Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır.

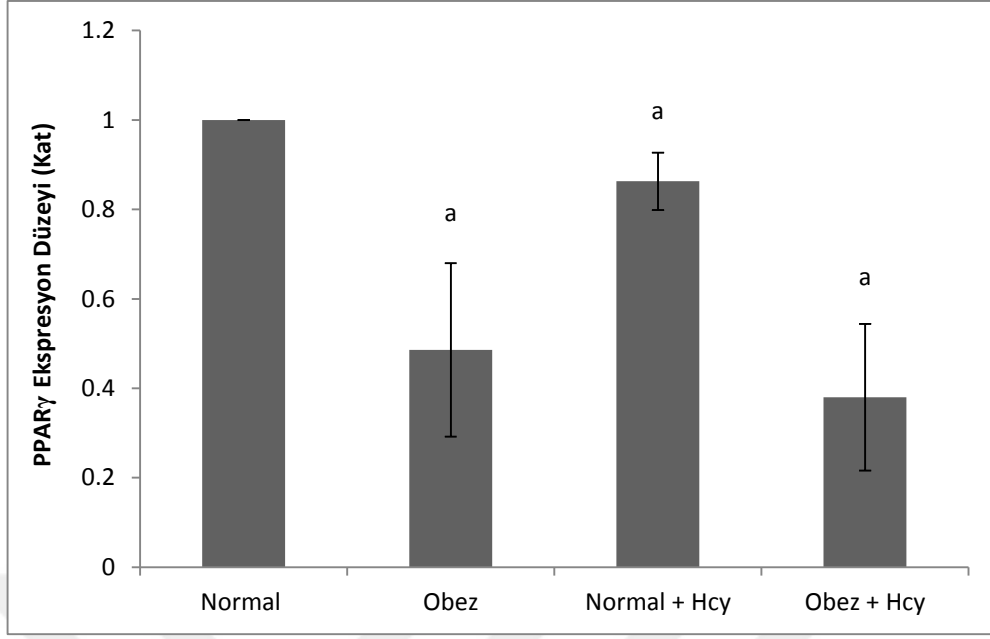
^aNormal grup ile karşılaştırıldığında $p < 0.01$, ^bNormal grup ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$

Epididimal yağ dokusundaki CD36, PPAR γ , C/EBP α gen ekspresyon sonuçları Şekil 8, 9, 10'da verilmiştir.



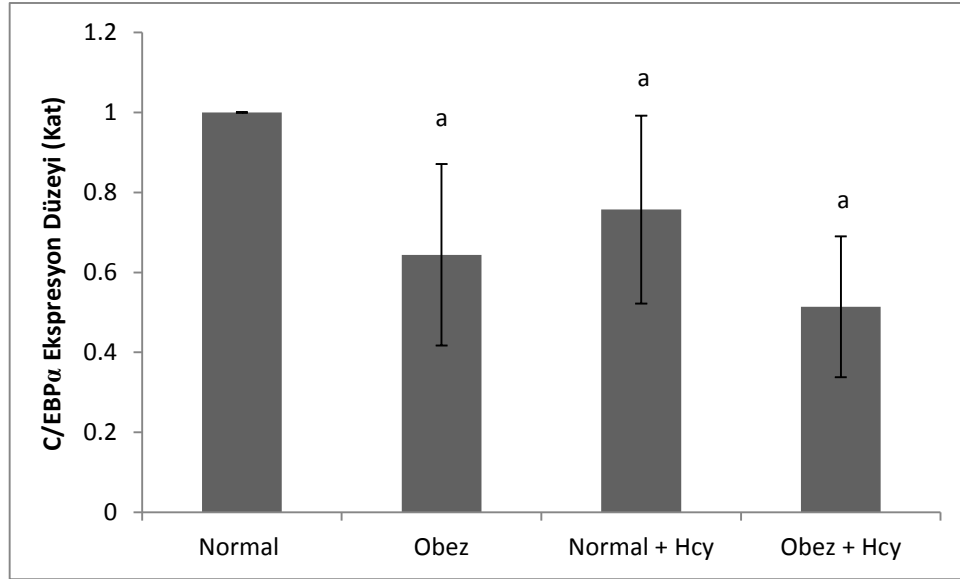
Şekil 8. Deney gruplarının CD36 gen ekspresyon analizi sonuçları (n=6) [^a Normal gruba göre anlamlı artış görüldü ($p < 0.01$). ^b Normal gruba göre anlamlı azalma görüldü ($p < 0.05$).]

Normal grup ile karşılaştırıldığında obez grupta CD36 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış görülürken ($p=0.003$), normal+Hcy ve obez+Hcy gruplarında anlamlı azalma görüldü (sırasıyla $p=0.002$, $p=0.04$).



Şekil 9. Deney gruplarının PPAR γ gen ekspresyon analizi sonuçları (n=6) [^a Normal gruba göre azalma görüldü (p< 0.01).]

PPAR γ gen ekspresyonunda normal grup ile karşılaştırıldığında, diğer gruplarda anlamlı azalma görüldü (sırasıyla p=0.003, p=0.002, p=0.002).



Şekil 10. Deney gruplarının C/EBP α gen ekspresyon analizi sonuçları (n=6) [^a Normal gruba göre azalma görüldü (p< 0.01).]

C/EBP α gen ekspresyonu normal grup ile karşılaştırıldığında diğer gruplarda anlamlı azaldığı görüldü (sırasıyla p=0.003, p=0.04, p=0.002).

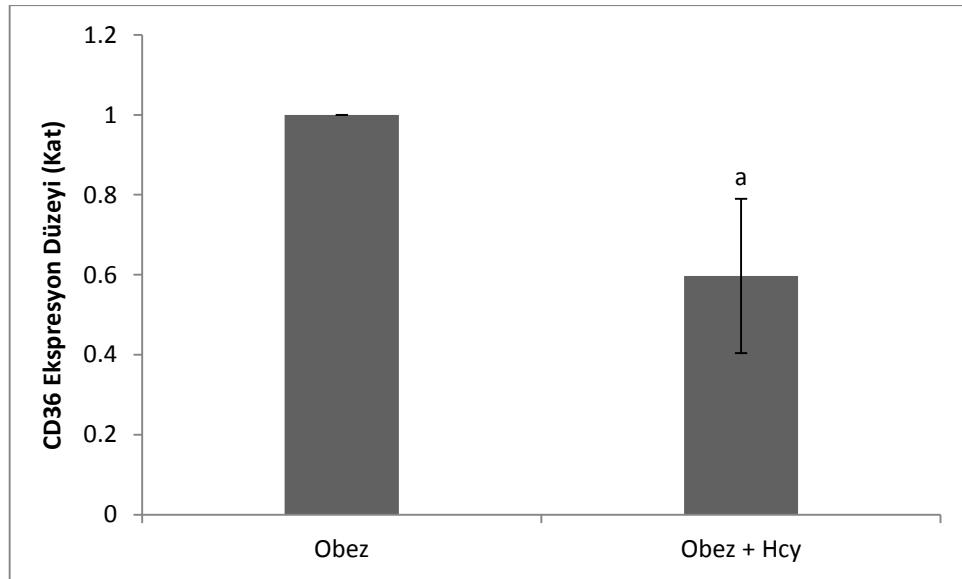
Epididimal yağ dokularındaki CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyonu sonuçları, obez gruba göre kıyaslanarak obez + Hcy grubun değerleri Tablo 11 ve Şekil 11, 12, 13’de gösterildi.

Tablo 11. Obez gruba göre Obez + Hcy grubunun CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyon sonuçları

Parametreler	Obez	Obez + Hcy	p
CD36	1 $\pm$ 0	0.597 $\pm$ 0.193	0.002
PPAR γ	1 $\pm$ 0	0.602 $\pm$ 0.217	0.002
C/EBP α	1 $\pm$ 0	0.698 $\pm$ 0.421	0.305

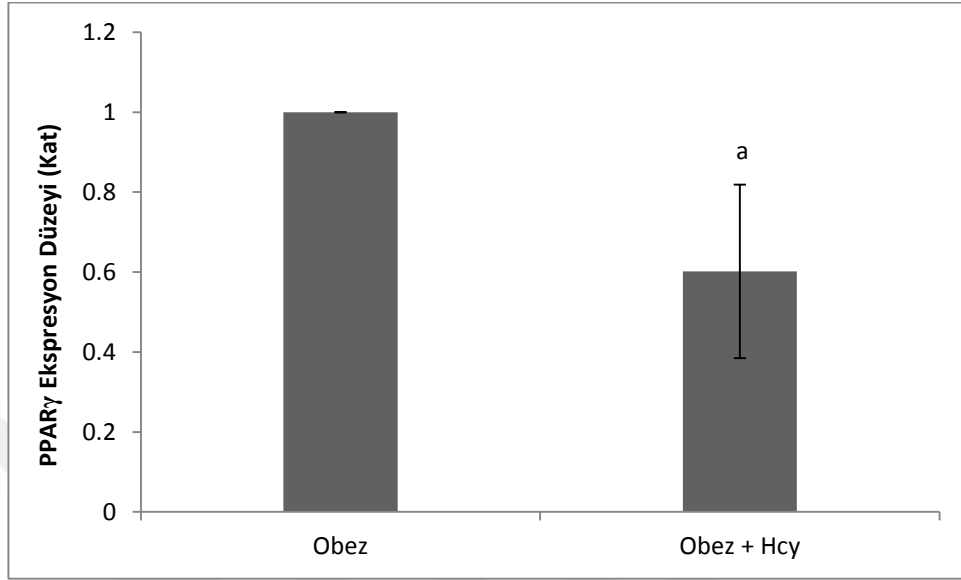
p, “Mann-Whitney U” ne göre verilmiştir.

Homosisteinin epididimal yağ dokusundaki CD36, PPAR γ , C/EBP α gen ekspresyon sonuçları Şekil.11, 12, 13’de verilmiştir.



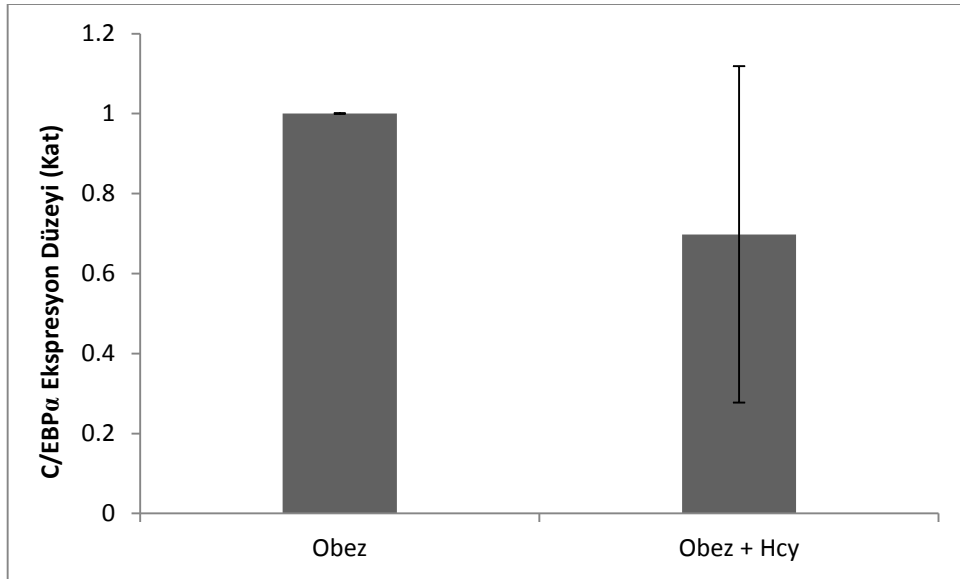
Şekil 11. Obez gruba göre Obez +Hcy grubunun CD36 gen ekspresyon analiz sonucu (n=6) [^a Obez gruba göre azalma görüldü (p< 0.01).]

CD36 gen ekspresyonunda, obez + Hcy grubunda obez gruba göre anlamlı azalma görüldü ($p=0.002$).



Şekil 12. Obez gruba göre Obez +Hcy grubunun PPAR γ gen ekspresyon analiz sonucu (n=6) [^a Obez gruba göre azalma görüldü ($p< 0.01$).]

PPAR γ gen ekspresyonunda, obez + Hcy grubunda obez gruba göre anlamlı azalma görüldü ($p=0.002$).



Şekil 13. Obez gruba göre Obez +Hcy grubunun C/EBP α gen ekspresyon analiz sonucu (n=6)

C/EBP α gen ekspresyonunda, obez + Hcy grubunda obez gruba göre bir azalma görölmesine rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.305).



7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Obezite günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Obezite, vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olmasından kaynaklanan ve vücut yağ kitlesinin artması ile karakterize, hem genetik hem de çevresel faktörlerden etkilenen bir hastalıktır. Obezitenin diyabet, üreme bozuklukları, gastrointestinal sistem bozuklukları, hipertansiyon, artrit, uyku apnesi, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi patolojiler için risk faktörü olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (2). Dünyadaki obezite sıklığının her geçen yıl artması, yeni önleyici ve tedavi edici protokollerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu protokollerin irdelenmesinde deneysel obezite modelleri çok önemli bir yer teşkil etmektedir. Deneysel obezite çalışmalarında transgenik hayvan kullanımı, diyet ile ya da cerrahi veya kimyasal ajanlar ile obezite oluşturma gibi farklı protokoller uygulanmaktadır. Bunlardan yüksek yağ içeriğine sahip diyetle oluşturulan obezite modeli invaziv olmaması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (43). Farelerin ve sıçanların çeşitli türlerinde yağ açısından zengin olan diyet ile besleme sonucu artan vücut ağırlığı ve diyabet oluşumu gösterilmiştir (44). Bu çalışmada deneysel diyet indüklü obezite modeli oluşturmada literatürdeki pek çok yayında da bu amaçla kullanılan Research Diet firmasından satın alınan D12492 ve D12450J kodlu yemler kullanıldı (45, 46). Bununla birlikte her fare ve rat türünde diyetle indüklenmiş obezite modeli oluşturulamamaktadır. Örneğin Sprague-Dawley cinsi ratlar bu modele farklı cevaplar verebilirken, A/J ve C57BL/KsJ cinsi fareler C57BL/6J cinsi farelere göre obeziteye karşı dirençlidirler. Yapılan literatür taramalarında C57BL/6J, 129X1/SvJ, BALB/c, DBA/2 ve FVB/N cinsi farelerin diyet indüklü obezite modellerinde sıklıkla kullanılan türler olduğu görülmüştür (47). Özellikle BALB/c türünde dişilerin erkeklere göre yüksek yağlı diyet indüklü obeziteye dirençli oldukları da bildirilmektedir (48). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada kolay elde edilmesi ve cerrahi araştırma merkezimizde sıklıkla üretilmesi bakımından deneysel obezite modeli oluşturmak üzere BALB/c fare türünün erkek bireyleri tercih edildi. Deneysel obezite modelimizde beslenme programı sonunda, obez gruplarda normal gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldüğünden dolayı obezite modelimizin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği kanaatine varıldı.

Obezitenin kardiyovasküler hastalıklarla sıkı bir ilişkisinin olduğu ve homosisteinin bu ilişkiye katkıda bulunan önemli bir molekül olduğu vurgulanmaktadır (49). Yüksek

homosistein seviyesi aterosklerotik damar hastalığı ve aterotromboz için bağımsız bir risk faktörüdür. Hiperhomosisteinemi vasküler hücrelerde çeşitli fonksiyonel değişiklikler, endotelial fonksiyon ve aktivasyon bozukluğu, düz kas hücrelerinin proliferasyonunun uyarılması, monositlerin uyarılması ve endotel hücrelerine adezyonu gibi birçok olayı uyarmaktadır. Homosisteinin aterojenik özelliklerini açıklamak üzere pek çok mekanizma ileri sürülmüştür. Özellikle Hcy'nin protein kinaz C (PKC)/c-fos sinyal yolağını ve koagülasyon kaskadını aktifleyerek, platelet agregasyonu ve LDL oksidasyonunu artırarak aterojenik özellik sergilediği olası mekanizmalar arasında ön plana çıkanlardır (15). Homosisteinin klinik yansımalarının ortaya konmasında deneysel hayvan modelleri sıklıkla tercih edilmektedir. Farelerde deneysel hiperhomosisteinemi modeli diyetel modifikasyonlar, genetik veya farmakolojik yaklaşımlar gibi pek çok şekilde oluşturulabilmektedir. Diyetel modifikasyonlardan bir tanesi de farelerin içme suyuna homosistein takviyesidir. İçme suyuna 12 hafta boyunca eklenen 0.9 g/L konsantrasyondaki Hcy'nin farelerin kan plazma homosistein seviyesini fizyolojik sınırların daha üst değerlerine çıkarabildiği gösterilmiştir (9, 50). Buradan hareketle bu çalışmada farelerin içme suyuna 12 hafta boyunca 0.9 g/L konsantrasyonda Hcy takviyesi yapılarak deneysel hiperhomosisteinemi modeli oluşturuldu.

Yağ dokusu, etrafı kan damarları, immün hücreler, kollajen lifleri ve fibroblastlar ile çevrili gevşek bağ dokusudur. Yağ dokusu adiposit hücrelerinden oluşmaktadır. Yağ dokusu bir endokrin doku gibi davranarak enerji dengesinin ayarlanmasında, nöroendokrin ve immün fonksiyonların düzenlenmesinde aktif rol alan proteinleri salgılamaktadır. Adipoz doku adipokinler olarak adlandırılan biyoaktif peptidlerin sentezlendiği ve salgılandığı yerdir (4). Yağ dokusu anatomik yerleşimine göre subkutan ve viseral yağ dokusu olarak sınıflandırılmaktadır. İnsan vücudundaki yağ dokusunun yaklaşık % 80'i yüzeysel ve derin subkutan yağ dokusudur. Subkutan yağ dokusu boyun, sırt, bel, karın, gluteal, femoral ve meme bölgesinde bulunmaktadır. Yağ dokusunun yaklaşık % 20'si ise viseral yağ olarak mide, bağırsak, pankreas, kalp, böbrek ve iç üreme organları çevresinde bulunmaktadır. Ayrıca kas içinde ve çevresinde az miktarda bulunan yağ dokusu da viseral yağ dokusuna dahil edilmektedir (51). Epididimal (gonadal) yağ doku farelerdeki en büyük yağ depolarından birisi olup, viseral yağ doku sınıflamasına girmektedir. Erkek farelerde testis, dişi farelerde ise over çevresinde yoğunlaşmaktadır. Epididimal yağ dokusunun büyüklüğü diyetle indüklenebilmektedir. Bu yağ dokusu türü subkutan yağ dokusuna göre

PPAR γ , SREBP1c ve C/EBP- α gibi anahtar adipogenik transkripsiyon faktörlerinin daha fazla eksprese edildiği bir dokudur. Epididimal yağ dokusu diğer yağ dokularıyla kıyaslandığında heterojenitesinin daha düşük ve saflığının daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Ayrıca epididimal yağ dokusu diğer yağ dokularından daha fazla sayıda mitokondriye sahiptir (52). Bu sebeplerden dolayı bu çalışmada epididimal yağ dokusu örneklerinin kullanılması tercih edildi.

mRNA ekspresyon analizlerinde Northern blot, RT-PCR, makroarray ve mikroarray gibi pek çok yöntem kullanılabilmektedir. Bu yöntemlerden RT-PCR uygulanmasının kolaylığı, kurulum ve analiz maliyetinin düşük olması, biyoinformatiğe gereksinim duymaması ve çok sayıda gen ürününe uygulanabilmesi gibi avantajlara sahiptir (53). RT-PCR tekniği ile DNA dizilerinin eş zamanlı olarak çoğaltılması ve reaksiyon süresi boyunca oluşan ürünlerin miktarının gözlenmesi mümkündür. Amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi RT-PCR'yi özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinde tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkan reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü floresans işaretli probalar ile sağlanmaktadır (54, 55). Hem mevcut imkanlarımız dahilinde olması hem de adı geçen avantajlarından dolayı bu çalışmada CD36, PPAR γ ve C/EBP α gen ekspresyon seviyelerinin ölçümü hedefe özgü floresans işaretli probalar kullanılarak RT-PCR yöntemi ile gerçekleştirildi.

RT-PCR ile elde edilen veriler mutlak kantitasyon (absolute quantification) veya göreceli kantitasyon (relative quantification) analiz teknikleri ile değerlendirilmektedir. mRNA ekspresyon çalışmalarında ise sıklıkla göreceli kantitasyon kullanılmaktadır. Bu teknikte aynı örneğe ait iki farklı hedef genin ekspresyon seviyeleri karşılaştırılır ve sonuç bu hedeflerin oranı olarak ifade edilir. Karşılaştırma amacıyla kullanılan ikinci gen "referans gen" olarak isimlendirilir ve tüm deney şartlarında değişmez miktarda eksprese olduğu kabul edilir. Bu referans gen internal kontrol olarak da bilinir ve örnekten örneğe olan farklılıkların değişiminin normalizasyonu için kullanılır. İlgilenilen hedef genin deney gruplarındaki ekspresyon seviyeleri muamelesiz grup (negatif kontrol) ekspresyon seviyeleri başlangıç alınarak rölatif olarak ifade edilir. Böylelikle rölatif kantitasyon, kullanıcılara bir hedef genin en az iki farklı durumdaki ekspresyon profilini kolayca karşılaştırma olanağı sağlar. Rölatif kantifikasyon gen ekspresyonunun belirlenmesinde en iyi teknik olarak kabul edilmektedir (56). Adipoz dokuda gerçekleştirilen gen ekspresyonu

alışmalarında sıklıkla β -aktin referans gen olarak kullanılmaktadır (9, 57). Hem n çalışmalarımızda deneysel işlemler sonucu negatif kontrol grubuna göre eşik değeriinin değışmemesi, hem de literatürde adipoz doku gen ekspresyon çalışmalarında kullanılmasından dolayı çalışmada referans gen olarak β -aktin tercih edildi. Hedef gen ekspresyon seviyeleri de rölatif kantitasyon modülü kullanılarak hesaplandı ve muamelesiz grup ekspresyon seviyeleri başlangıç alınıarak kat olarak ifade edildi.

CD36, birçok hücre yüzeyinde bulunan 88 kDa molekül ağırlığına sahip bir transmembran glikoproteindir. CD36; monositler, makrofajlar, trombositler, mikrovasküler endotel hücreleri, adipositler, böbrek ve kalp miyositlerindeki epitel hücrelerinden eksprese edilmektedir. CD36; trombospondin-1, okside fosfolipidler, okside LDL, hekzarelin, fibriler beta amiloid peptidler ve uzun zincirli yağ asitleri gibi molekülleri bağlama özelliğine sahiptir. Aterojenik süreç makrofajların farklılaştığı arteriyel intima alanına kanda dolaşan monositlerin transmigrasyonuyla başlamaktadır. Özellikle makrofajlar CD36 aracılığıyla okside LDL'yi bağlayarak hücre içine alırlar. Zamanla makrofajlardan köpük hücre oluşumu ateroskleroz için başlangıç aşaması olarak kabul edilmektedir (19). Adipositler hiperkolesterolemik koşullar altında CD36 aracılığıyla dolaşımdan okside LDL'leri almakta ve okside LDL'lerin kandaki seviyelerini azaltmaktadırlar. Bu özelliğinden dolayı adipoz doku dolaşımdaki kolesterol için bir "tampon havuzu (buffering pool)" olarak düşünülmektedir. Bu durum çoğu araştırmacı tarafından adipositlerin aterosklerozun tedavisinde potansiyel bir hedef olarak grlmesine neden olmuştur (58). Ayrıca CD36 adiposit farklılaşmasında ve adipogenezde önemli fonksiyonlara sahiptir.

Plazma Hcy seviyesi ile kardiyovasküler hastalık riski arasında pozitif korelasyon olduğu ileri sürülmektedir. Bu ilişkinin Hcy'nin LDL oksidasyonunu, serbest radikalleri ve endotel hasarını artırmasından, ayrıca nitrik oksit metabolizmasını bozmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (59). Bununla birlikte Hcy'nin ateroskleroz oluşumunda çok önemli bir rol oynayan CD36 zerine etkisini inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Mentеше ve arkadaşları 3T3-L1 hücrelerinde yaptıkları çalışmada Hcy'nin adiposit farklılaşmasını azalttığını, ancak CD36 gen ekspresyonu üzerine etkisi olmadığını göstermişlerdir (15). Ide ve arkadaşları ise insan makrofaj hücrelerinde 50 ve 200 μ M konsantrasyonlardaki Hcy'nin CD36 gen ekspresyonunu sırasıyla % 18 ve % 41 oranında arttırdığını ortaya koymuşlardır (60). İn vivo çalışmalarda ise Hcy ile beslenen apoE^{-/-} fareler normal diyetle

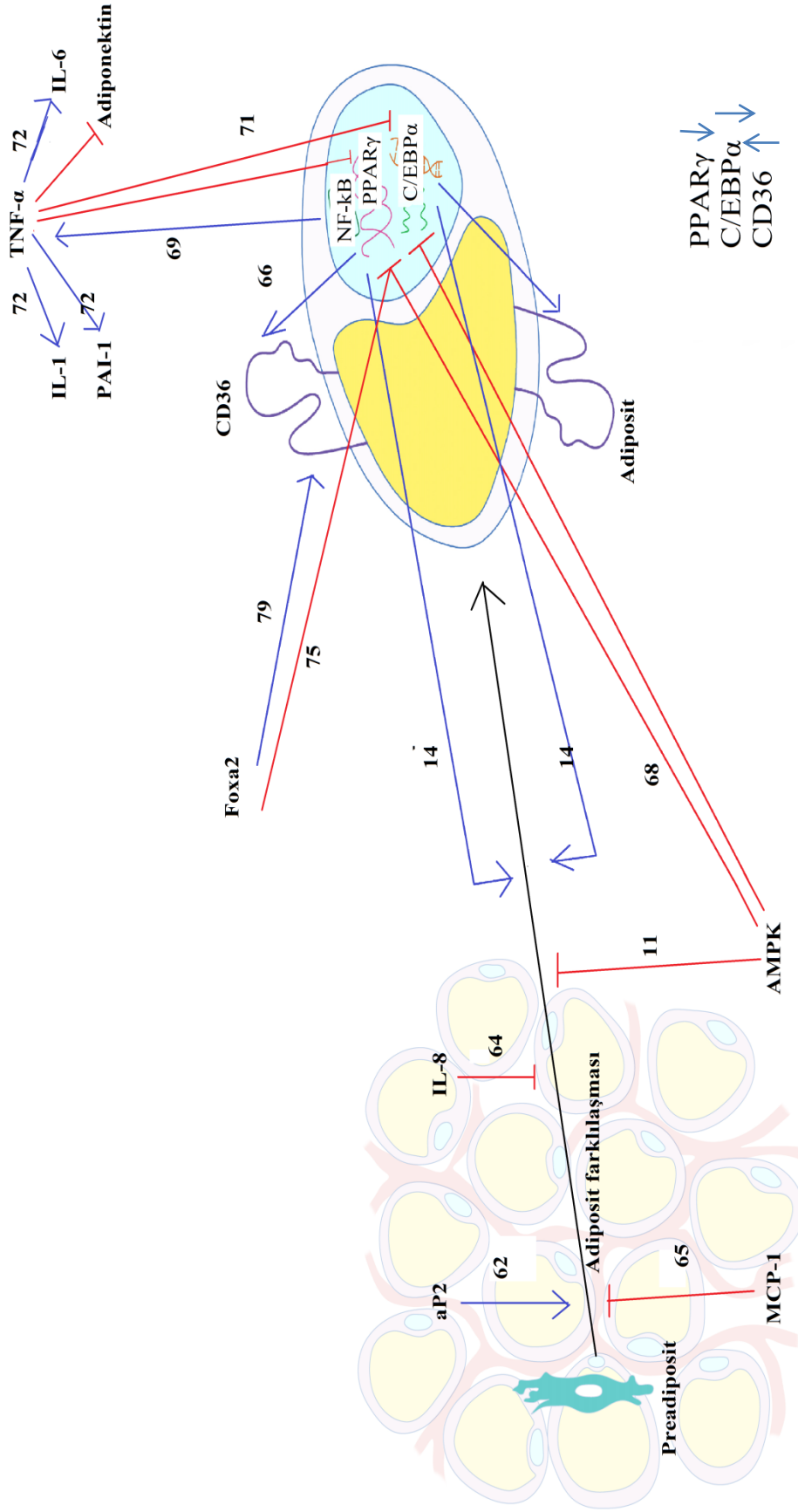
beslenen apoE^{-/-} farelerle karşılaştırıldığında, Hcy ile beslenen farelerde plazma okside LDL seviyelerinin arttığı, buna bağlı olarak da aterosklerotik lezyonlarda ve CD36 gen ekspresyonunda bir artış olduğu gösterilmiştir (9). Literatürde normal fareler üzerinde Hcy'nin aterosklerotik süreçte önemli bir rol oynayan CD36 ile ilişkisini ortaya koyan bir çalışmanın bulunmamasından hareketle planlanan bu çalışmada, Hcy'nin normal farelerin yağ dokusundaki CD36 gen ekspresyonunu anlamlı şekilde azalttığı bulundu ($p=0.002$). Ayrıca CD36 gen ekspresyonunun obeziteyle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($p=0.003$) bulunurken, Hcy'nin obezlerde de CD36 gen ekspresyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı gözlemlendi ($p=0.04$).

Adiposit farklılaşması incelendiğinde, PPAR γ ve C/EBP α 'nın farklılaşmanın erken evrelerinde sentezlendiği ve obezite gelişimine katkıda bulundukları bilinmektedir (61). Çalışma sonuçlarımıza göre hem PPAR γ hem de C/EBP α gen ekspresyon seviyelerinin obez grupta normal gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p<0.05$). Hcy takviyesi ile hem PPAR γ hem de C/EBP α gen ekspresyon seviyelerinin kendi kontrollerine göre düşük seviyelerde seyrettiği izlendi. Literatür incelendiğinde sonuçlarımızla paralel olarak artmış Hcy seviyeleri ile PPAR γ ekspresyon seviyeleri arasında negatif bir korelasyon olduğu bildirilmektedir (Şekil 14) (62, 63). Wang ve arkadaşları 3T3-L1 adiposit hücre serilerinde yaptıkları çalışmada Hcy'nin PPAR γ ve onun hedef genlerinden olan adiposit protein 2 (aP2) ekspresyonunu azaltarak adipogenezi inhibe ettiğini göstermişlerdir (63). Hcy'nin IL-8 ve MCP-1 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin seviyelerini artırdığı ve artan sitokinlerin de adipogenezi azalttığı bildirilmektedir (Şekil 14) (64, 65). Adipositlerde β -adrenerjik uyarılar, HDL, Hcy ve eikopentaenoik asit gibi endojen faktörlerin etkisiyle AMP-tarafından aktive edilen protein kinaz (AMPK)'nın stimüle edildiği bilinmektedir (Şekil 14) (66, 67). Proliferasyon ve adipogenez anabolik süreçlerdir ve AMPK tarafından inhibe edilmektedirler. AMPK, adipogenezi özellikle C/EBP β , PPAR γ , C/EBP α , FAS, aP2 ve SREBP-1c gibi adipogenezin temel transkripsiyon faktörleri ve fonksiyonel proteinlerinin miktarını azaltarak baskılamaktadır (Şekil 14) (66). Obezite gelişiminde yağ doku kitlesinin artışına katkı vermeleri nedeniyle PPAR γ ve C/EBP α ekspresyon seviyelerinin obez grupta daha yüksek seyretmesi beklenebilirdi. Adipositler belirli bir eşik büyüklüğüne ve sayısına ulaştıca adipositlerden salınan çeşitli faktörler makrofaj aktivasyonuna ve infiltrasyonuna sebep olmaktadır. Bu aşamada TNF- α stimülasyonu altında preadipositlerden salınan

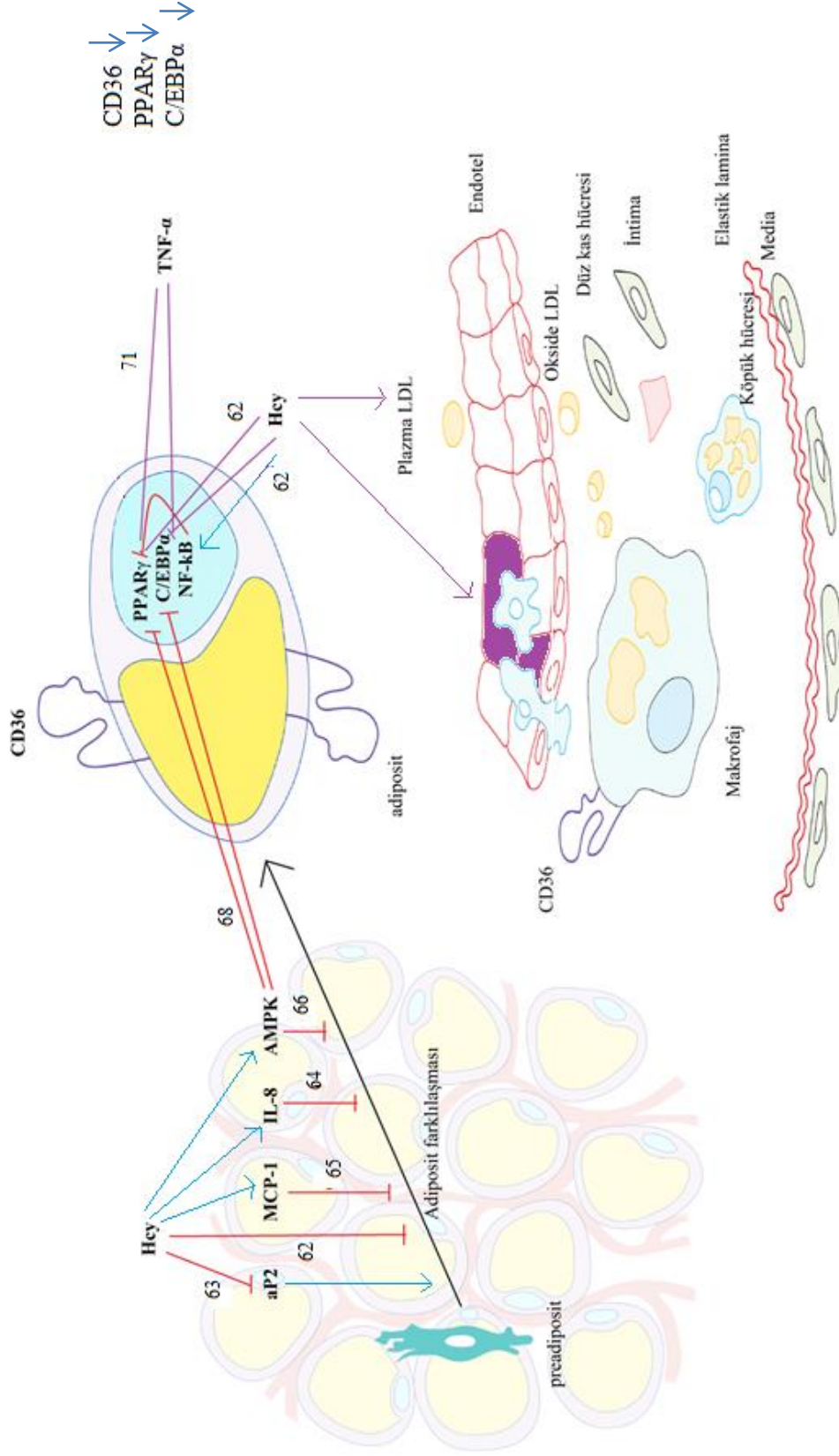
kemokinler de makrofaj infiltrasyonuna katkıda bulunmaktadır (Şekil 14) (68). Genel stres cevabında NF- κ B, nukleusta PPAR γ aktivitesini baskılayarak lipidlerin mobilizasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca NF- κ B; TNF- α , IL-1, IL-6 ve MCP-1 gibi pek çok inflamatuvar sitokin de transkripsiyonunu arttırmaktadır (Şekil 14) (69). Vidal-Puig ve arkadaşları yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde TNF- α mRNA ekspresyonunun önemli derecede arttığını bildirmişlerdir (70). TNF- α 'nın PPAR γ ve C/EBP α ekspresyonunu azaltarak adipogenezi inhibe etme potansiyelinden yola çıkarak, TNF- α 'daki bu artışın yağ depolarının daha fazla büyümesini önlemeye yönelik adaptif bir kontrol mekanizması olduğunu savunmuşlardır (70, 71). Obez farelerin adipoz dokularında TNF- α seviyelerinin arttığı bildirilmekte ve bu artışın PAI-1 ve IL-6 gibi aterosjenik adipokinlerin miktarını arttırdığı ve adiponektin gibi anti-aterojenik adipokinleri ise azalttığı gösterilmiştir (Şekil 14) (72). Dolayısıyla obez grubumuzda zamanla artan inflamatuvar cevap, adipogenezde görev alan önemli düzenleyici transkripsiyon faktörlerinden PPAR γ ve C/EBP α ekspresyon seviyelerinin azalmasına sebep olmuş olabilir. Azalan PPAR γ ve C/EBP α seviyelerinde bile CD36 ekspresyon seviyelerinin nasıl hala yüksek seyrettiği paradoks olarak görülebilir. Her ne kadar PPAR α , PPAR γ , PXR, NR4A (Nu 77) ve Foxa2 (HNF3 β) gibi transkripsiyon faktörlerinin CD36 gen ekspresyonunu düzenledikleri gösterilmiş olsa da bu transkripsiyon faktörlerinin doğrudan CD36 promotor bölgesine bağlandıklarına dair bir kanıt bulunamamıştır. Ayrıca son araştırmalarda CD36 promotor bölgesinin oldukça komplike olduğu ve alternatif transkripsiyon başlama bölgelerini içerdiği de gösterilmiştir (73). Obezite ve tip II diyabet patolojilerinde yağ dokuda CD36 gen ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (74). Diyetle indüklenmiş obezite modelinde farelerde CD36'nın önemli düzenleyici proteinlerinden olan Foxa2 (Hepatosit nükleer faktörler-3 (Foxa1-3))'nin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Artmış Foxa2 ekspresyonunun da adiposit farklılaşma ve olgunlaşma faktörlerinden PPAR γ , aP2 ve yağ asidi sentaz gibi proteinleri inhibe ettiği bildirilmektedir (Şekil 14) (75). PPAR γ 'nın C/EBP α yokluğunda bile adipogenezi uyarabildiği gösterilmişken, C/EBP α 'nın ise PPAR γ yokluğunda adipogenezi indükleyemediği gösterilmiştir. Dolayısıyla her iki transkripsiyon faktörünün de adipogenez için önemli olduğu, fakat esas öncü etkinin PPAR γ 'dan kaynaklandığı ileri sürülmüştür (76, 77). Literatürde Foxa ailesi proteinlerinin yağ asidi taşıyıcı proteinleri üzerinde herhangi bir inhibisyonu gösterilmemekle birlikte (78), özellikle Foxa2'nin CD36 gen ekspresyonunu arttırdığı ortaya konmuştur (Şekil 14) (79). Özellikle obez grupta düşük

PPAR γ ve C/EBP α ekspresyon seviyelerine rağmen, yüksek seyreden CD36 ekspresyon seviyesinin aktiflenmiş Foxa2 proteininin aktivitesinin bir sonucu olabileceği kanaatindeyiz.

Sonuç olarak hiperhomosisteineminin kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğu bilinmekte olup, bu etkinin mekanizması henüz ortaya konmamıştır. Çalışma sonuçlarımıza göre Hcy'nin hem obezlerde hem de normal farelerde CD36 gen ekspresyonunu azaltması sonucu yağ dokuya okside LDL girişinin azaldığı düşünülebilir. Bu girişin azalmasıyla kandan okside LDL'lerin en önemli toplayıcısı olarak makrofajlar ön plana çıkacaktır. Makrofajlarda biriken okside LDL'lerin zamanla köpük hücre oluşumunu indüklediği ve ateroskleroza zemin hazırlayabildiği düşünülürse hiperhomosisteineminin zararlarının mekanizmalarının açıklanması açısından bu çalışmanın ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz (Şekil 15).



Şekil 14. Obez fare epididimal yağ dokusunda CD36, PPARγ, C/EBPα'nın gen ekspresyonlarının muhtemel mekanizması (Şekildeki numaralandırmalar kaynaklara aittir.)



Şekil 15. Obez fare epididimal yağ dokusunda CD36, PPAR γ , C/EBP α 'nın gen ekspresyonu üzerine homosistein etkisinin muhtemel mekanizması (Şekildeki numaralandırmalar kaynaklara aittir.)

8. KAYNAKLAR

1. Shamseddeez H, Getty JZ, Hamdallah IN, Ali MR (2011). Epidemiology and economic impact of obesity and type 2 diabetes. *Surg Clin N Am* 91: 1163-1172.
2. Kuzcmarski RJ, Flegal KM (2000). CDC growth charts. *United States Adv Data* 314: 1-27.
3. Cook JW, Taylor LM, Orloff GJ, Landry GL, Moneta JM, Porter (2002). Homocysteine and arterial disease-experimental mechanisms. *Vsc Pharmacol* 5: 293-300.
4. Menteşe A (2011). Homosisteinin yağ dokusunda okside LDL reseptörü gen ekspresyonu üzerine etkisi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
5. Coburn CT, Knapp FF Jr, Febbraio M, Beets AL, Silverstein RL, Abumrad NA (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* 275: 32523-32529.
6. Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 58 :95–101.
7. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108: 785-791.
8. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 268:11811–11816.
9. Thampi P, Stewart BW, Joseph L, Melnyk SB, Hennings LJ, Nagarajan S (2008). Dietary homocysteine promotes atherosclerosis in apoE-deficient mice by inducing scavenger receptors expression. *Atherosclerosis* 197(2): 620-629.
10. Zhang L, Chawla A (2004). Role of PPARgamma in macrophage biology and atherosclerosis. *Trends Endocrinol Metab* 15(10):500-505.
11. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM (1998). OxLDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR gamma. *Cell* 93:229-240.
12. Nicholson AC (2004). Expression of CD36 in Macrophages and atherosclerosis the role of lipid regulation of PPARg signaling. *Trends Cardiovasc Med* 14:8–12.

13. Rosenson RS (2007). Effects of peroxisome proliferator-activated receptors on lipoprotein metabolism and glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 99(4A):96B-104B.
14. Ramji DP, Foka P (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: Structure, function and regulation. *Biochem J* 365(3): 561-575.
15. Mentese A, Alver A, Sumer A, Demir S (2016). Effects of homocysteine on adipocyte differentiation and CD36 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Commun Signal* 10(1): 55-60.
16. Şenel F (2010). Obezite. *Bilim ve Teknik Dergisi* 497: 86-87.
17. Ruser CB, Sanders L, Brescia GR, Talbot M, Hartman K, Vivieros K, Bravata DM (2005). Identification and management of overweight and obesity by internal medicine residents. *JGIM* 20; 12: 1139–1141.
18. Obesity and overweight, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> 5 June 2015.
19. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley OR (1993). *Temel Histoloji* (Çev. Y. Aytakin). Barış kitapevi.150-158.
20. Gimble JM (2003). Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Therapy* 3(5): 705-713.
21. Frühbeck G (2001). *Adipose Tissue Protocols. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders*. New jersey: 1-22.
22. Ahima RS, Flier JS (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11:327-332.
23. Ergün A (2005). Adipose tissue and the adipocyte. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 25: 412-420.
24. Abumrad NA, El-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is included during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem* 268:17665–17668.
25. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM, Rayudu PV (1997). Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl- D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(11):5923-5928.

26. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC, Shea TB (2003). Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. *Neurobiol Dis* 14(1):32-42.
27. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z, Penix L (2000). Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. *J Neurosci* 20:6920-6926.
28. Kruman II, Kumaravel TS, Lohani A, Pedersen WA, Cutler RG, Kruman Y (2002). Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22:1752-1762.
29. Jiang X, Yang F, Brailoiu E, Jakubowski H, Dun NJ, Schafer AI, Yang X, Durante W, Wang H (2007). Differential regulation of homocysteine transport in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*1976-1983.
30. Blom HJ, Smulders Y (2011). Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects, *J Inherit Metab Dis* 34(1):75-81.
31. McCully KS (1969). Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 56:111-128.
32. Utku U, Çelik Y (2002). Strokta etyoloji, sınıflandırma ve risk faktörleri. *Serebrovasküler Hastalıklar: Güneş Kitabevi Yayınları, Ankara* : 49-61.
33. Park YM (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med* 46:e99.
34. Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 75(3):468-477.
35. Türker K (2011). Tip 2 diyabetik hastalar ile diabeti olmayan kardeşlerinde TCF7L2 ve PPAR- γ genlerindeki genetik polimorfizmin PCR RFLP metodu ile araştırılması. *Uzmanlık Tezi, Isparta*.
36. Poulsen L, Siersbæk M, Mandrup S (2012). PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 23(6):631-639.
37. Grygiel-Górniak B (2014). Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J* 13: 17.

38. Janani C, Ranjitha Kumari BD (2015). PPAR gamma gene--a review. *Diabetes Metab Syndr* 9(1):46-50.
39. Lin Y, Zhao J, Hu X, Wang L, Liang L, Chen W (2016). Transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha up-regulates microRNA let-7a-1 in lung cancer cells by direct binding. *Cancer Cell Int* 16:17.
40. Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE (2011). The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* 54(1):6-19.
41. Kubista M, Andrade JM, Bangtsson M, Forootan A (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27 (2-3): 95-125.
42. Telmann G, Geulen O (2006). Light cycler 480 real-time PCR system: Innovative solutions for relative quantification. *Biochemica* 4: 16-18.
43. Lutz TA, Woods SC (2012). Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol* 61:58.
44. Wang CY, Liao JK (2012). A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol* 821: 421-433.
45. Liu LF, Purushotham A, Wendel AA, Belury MA (2007). Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity, insulin sensitivity, and hepatic steatosis in high-fat-fed mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: 1671-1682.
46. Johnson JA, Trasino SE, Ferrante AW, Vasselli JR (2008). Prolonged decrease of adipocyte size after rosiglitazone treatment in high- and low-fat-fed rats. *Obesity* 15(11): 2653-2663.
47. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, Turner N (2013). Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia* 56: 1129-1139.
48. Nishikawa S, Yasoshima A, Doi K, Nakayama H, Uetsuka K (2007). Involvement of sex, strain and age factors in high fat diet-induced obesity in C57BL/6J and BALB/cA mice. *Exp Anim* 56(4): 263-272.

49. Villela MP, Andrade VL, Eccard B, Jordão AA, Sertório JT, Tanus-Santos JE, Silva IF, Silveira JN, Sandrim VC (2014). Homocysteine and nitrite levels are modulated by MTHFR 677C>T polymorphism in obese women treated with simvastatin. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 41(10):744-747.
50. Dayal S, Lentz SR (2008). Murine models of hyperhomocysteinemia and their vascular phenotypes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1596-1605.
51. Kahraman C (2013). Diyetle indüklenmiş obezitede yağ dokusundaki oksidan antioksidan dengenin incelenmesi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
52. Bjørndal B, Burri L, Staalesen V, Skorve J, Berge RK (2011). Different adipose depots: Their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes* 490650: 1-15.
53. Fryer RM, Randall J, Yoshida T, Hsiao LL, Blumenstock J, Jensen KE, Dimofte T, Jensen RV, Gullans SR (2002). Global analysis of gene expression: Methods, interpretation, and pitfalls. *Experimental Nephrol* 10: 64-74.
54. Kubista M, Andrade JM, Bangtsson M, Forootan A (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27 (2-3): 95-125.
55. Wilhelm J, Pingoud A (2003). Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 4(11): 1120-1128.
56. Telmann G, Geulen O (2006). Light cycler 480 real-time PCR system: Innovative solutions for relative quantification. *Biochemica* 4: 16-18.
57. Soronen J, Laurila PP, Naukkarinen J, Surakka I, Ripatti S, Jauhiainen M, Olkkonen VM, Yki-Jarvinen H (2012). Adipose tissue gene expression analysis reveals changes in inflammatory, mitochondrial respiratory and lipid metabolic pathways in obese insulin-resistant subjects. *BMC Med Genomics* 5: 9.
58. Wu ZH, Zhao SP (2006). Adipocyte: A potential target for the treatment of atherosclerosis. *Med Hypotheses* 67(1): 82–86.
59. Tzotzas T, Evangelou P, Kiortsis DN (2011). Obesity, weight loss and conditional cardiovascular risk factors. *Obesity Reviews* 12: e282-e289.
60. Ide N, Keller C, Weiss N (2006) Aged garlic extract inhibits homocysteine-induced CD36 expression and foam cell formation in human macrophages. *J Nutr* 136(3 Suppl):755S–758S.

61. Sung SH, Mina Lee M (2015). Anti-adipogenic activity of a new cyclic diarylheptanoid isolated from *Alnus japonica* on 3T3-L1 cells via modulation of PPARc, C/EBPa and SREBP1c signaling. *Bioorg Med Chem Lett* 25: 4648–4651.
62. Mujumdar VS, Tummalapalli CM, Aru GM, Tyagi SC (2002). Mechanism of constrictive vascular remodeling by homocysteine: role of PPAR. *Am J Physiol Cell Physiol* 282(5): C1009-C1015.
63. Wang Z, Dou X, Yao T, Song Z (2011). Homocysteine inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Exp Biol Med* 236:1379-1388.
64. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW (2001). Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells. *Circulation* 103:2717-2723.
65. Zhou H, Yang X, Zhang YO, Cai GP (2008). Interleukin-8 inhibits clonal expansion of 3T3-L1 preadipocyte during differentiation. *Chin J Appl Physiol* 24(2):243-247.
66. Bijland S, Mancini SJ, Salt IP (2013). Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clin Sci* 124: 491-507.
67. Wang Z, Pini M, Yao T, Zhou Z, Sun C, Fantuzzi G, Song Z (2011). Homocysteine suppresses lipolysis in adipocytes by activating the AMPK pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 30: E703-E712.
68. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-1830.
69. Ye J, Keller JN (2010). Regulation of energy metabolism by inflammation: A feedback response in obesity and calorie restriction. *Aging* 2(6): 361-368.
70. Vidal-Puig A, Jimenez-Liñan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE (1996). *J Clin Invest* 97(11): 2553-2561.
71. Sethi JK, Hotamisligil GS (1999). The role of TNF α in adipocyte metabolism. *Cell Dev Biol* 10: 19-29.
72. Fuentes E, Guzmán-Jofre L, Moore-Carrasco R, Palomo I (2013). Role of PPARs in inflammatory processes associated with metabolic syndrome (Review). *Mol Med Reports* 8: 1611-1616.

73. Cheung L, Andersen M, Gustavsson C, Odeberg J, Fernández-Pérez L, Norstedt G, Tollet-Egnell P (2007). Hormonal and nutritional regulation of alternative CD36 transcripts in rat liver-a role for growth hormone in alternative exon usage. *BMC Mol Biol* 8: 60.
74. Bonen A, Tandon NN, Glatz JFC, Luiken JJFP, Heigenhauser GJF (2006). The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes. *Int J Obes* 30: 877-883.
75. Wolfrum C, Shih DQ, Kuwajima S, Norris AW, Kahn CR, Stoffel M (2003). Role of Foxa-2 in adipocyte metabolism and differentiation. *J C I* 112: 345-356.
76. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2002). C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes Dev* 16(1): 22-26.
77. Siersbaek R, Nielsen R, Mandrup S (2010). PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Lett* 584(15): 3242-3249.
78. Moya M, Benet M, Guzman C, Tolosa L, Garcia-Monzon C, Pareja E, Castell JV, Jover R (2012). Foxa-1 reduces lipid accumulation in human hepatocytes and is down-regulated in nonalcoholic fatty liver. *PLoS One* 7(1): e30014.
79. Wolfrum C, Asilmaz E, Luca E, Friedman JM, Stoffel M (2004). Foxa-2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* 432: 1027-1032.

9. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ**

Çalışmanın Adı : "Diyette İndüklennmiş Obez Farelerin Yağ Dokusunda CD36 Gen Ekspresyonu Üzerine Homosisteinin Etkisinin İncelenmesi"

Çalışmacılar : Doç.Dr.Ahmet MENTEŞE, Doç.Dr.Ahmet ALVER, Dr.Ayşegül SÜMER, Arş.Gör.Selim DEMİR, Arş.Gör.Diler US ALTAY

Anabilmek Dalı: Tıbbi Biyokimya

Etik Kurul Dosya No 2014/ 15	Etik Kurul Toplantı Tarihi 08.04.2014	Etik Kurul Toplantı No 2014/07	Etik Kurul Karar No 1
------------------------------------	---	--------------------------------------	-----------------------------

Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Eczacılık Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN'ın başkanlığında; "Diyette İndüklennmiş Obez Farelerin Yağ Dokusunda CD36 Gen Ekspresyonu Üzerine Homosisteinin Etkisinin İncelenmesi" başlığını taşıyan çalışmanın, Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütmektebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (08.04.2014)

Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

10. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı: DOĞRAMACI Şeniz

Uyruğu: T.C

Doğum tarihi ve yeri: 26/08/1990 Altındağ/ ANKARA

Medeni hali:Bekar

Telefon: 0462 3777867

E-Posta: seniz_574@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

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

YABANCI DİL

İngilizce

HOBİLER

Kitap okumak, müzik dinlemek, spor yapmak.

