AYDA TEZOL YILMAZ

OBEZİTEDE ADİPOZİT MİTOKONDRİ FONKSİYONU VE LAKTAT SEVİYESİ ÜZERİNE MTDNA 4977 DELESYONUNUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İSTANBUL, 2019

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

OBEZİTEDE ADİPOZİT MİTOKONDRİ FONKSİYONU VE LAKTAT SEVİYESİ ÜZERİNE MTDNA 4977 DELESYONUNUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

AYDA TEZOL YILMAZ

DANIŞMAN
PROF.DR.TURGUT ULUTİN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI/
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

Bu çalışma 20.12.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Doktora Programı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. TURGUT ULUTİN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D – Danışman

Prof. Dr. İLHAN ÖZARAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakülte Tıbbi Biyoloji A.D

Doç. Dr. FAHRİ AKBAŞ
Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D

Doç. Dr. AHMET OZAYDIN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D

Doç. Dr. UMUT KÜÇÜKSEZER
İstanbul Üniversite Tıp Fakültesi
DETAM

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ayda TEZOL YILMAZ

İTHAF

Canım Annem ve Babama ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü lisans eğitimimden başlayarak Yüksek Lisans ve Doktora dönemimde Tez Danışmanım olan her zaman desteğini gördüğüm değerli hocam Prof.Dr. Turgut Ulutin'e teşekkür ederim. Bana inandığınız ve güvendiğiniz için, bu yolda beni her zaman teşvik ettiğiniz için size ne kadar teşekkür etsem azdır.

Üniversiteye başladığım yıllarda abim olan, sonrasında doktora tezim boyunca hem hocam hem abim olan değerli hocam Prof. Dr. İlhan Onaran'a teşekkür ederim. Her zaman yanımda olduğunuz; çalışkan ve azimli kişiliğiniz ile bana örnek olduğunuz, çalışmalarım boyunda akademik deneyimleriniz ile bana kattıklarınız için çok ama çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın başlangıcından itibaren her zaman fikirlerine ihtiyaç duyduğum, çalışmalarım sırasında her an desteğini gördüğüm kişi olan Doktor Öğr. Üyesi Nurten Bahtiyar'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında fikir alışverişi yaptığım, çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Ayla Karimavo'ya teşekkür ederim.

Altınbaş Ünv. Dekan Yardımcısı Dr. Öğr. Üyesi Ayça Doğan Mollaoğlu'na FTIR yöntemi ile ilgili çalışmalardaki desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında omuzlarım düştüğünde her zaman içimi rahatlatan, her daim yanımda olan gerçek dostlarıma en kıymetlilerim İlknur Bayazıt, Jülide Altınışık'a teşekkür ederim.

Tez çalışmama tekrar başlangıç yapmak adına beni teşvik eden, her zaman desteğini gördüğüm Kurtsan İlaçları Satış Pazarlama Müdürü Mehmet Kerem Gökçen'e teşekkür ederim.

Canım ailem ablam (elim, kolum her şeyimsin sen olmazsan her şeyim eksik olurdu), babam, abim, eniştem, yengem, yeğenlerim (Gökçe, Alpcan, Efe, Asena) siz iyi ki varsınız biz iyi ki büyüyen kocaman güzel bir aileyiz. Huzuruz bana her zaman güç verdi. Teşekkür ederim her zaman, her anımda elinizi omzumda hissettiğim için.

Benim çekirdek ailemin reisi, eşim, yol arkadaşım Dr. Alper Gabriel Yılmaz seninle güzelleşti hayat; her anımda nefesim olduğun için, bazen yetişemeyecek stresi ile

kafanı şişirdiğimde sabırla beni rahatlattığın için, benimle oturup günlerce literatür çevirisi yaptığın için, huzurum olduğun için teşekkür ederim. Oğullarım Ada, Rüzgar, Bora, Ateş size çok teşekkür ederim. Hayattaki en güzel armağan sizsiniz.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:TDK-2017-25381

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ii
BEYAN iii
İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vii
TABLOLAR LİSTESİ ix
ŞEKİLLER LİSTESİ x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ xii
ÖZET xiii
ABSTRACT xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. OBEZİTE 3
2.2. EPİDEMİYOLOJİ 4
2.2.1. Dünyada ve Türkiye'de Obezite 4
2.3. OBEZİTE PATOGENEZİ 7
2.3.1. Obezite Ve Hipoksi Metabolizmasi 9
2.4. YAĞ ASİDİ OKSİDASYONU 11
2.5. GLİKOLİZ MEKANİZMASI-LAKTAT SENTEZİ 15
2.6. MİTOKONDRİ 18
2.6.1. Oksidatif Fosforilasyon (OXPHOS) 20
2.6.2. Mitokondriyal DNA 22
2.6.3. Mitokondriyal DNA Delesyonları 25
2.6.4. Mitokondriyal DNA Delesyonlari Ve Oksidatif Fosforilasyon Mekanizmasina Etkisi 27
2.7. Mt DNA 4977 DELESYONU 28
3. TEZ MATERYAL VE METOD 31
3.1. YÖNTEMLER: 31
3.1.1. Seçilen Örneklerin Tanımı: 31
3.1.2. Çalışma Grubu; 31
3.1.3. Dokuların Toplanması ve Saklanma Koşulları: 31

3.1.4. Yağ Dokusundan DNA İzolasyonu: 31
3.1.5. DNA İzolasyon Yöntemi: 31
3.1.6. MtDNA 4977Delesyon Analizi 33
3.1.7. Doku Laktat Üretiminin Ölçülmesi....35
3.1.8. Data Analiz: 37
3.1.9. Doku ATP Miktarının Ölçülmesi....37
3.1.10. FTIR (Fourier Kızılötesi Dönüşümü) 39
3.1.11. FTIR Veri Toplama....42
3.1.12. İstatistiksel Analiz....44
4. BULGULAR....45
4.1. Grupların Demografik Verileri 45
4.2. Delesyon Taraması....45
4.3. Laktat seviyesi ölçümü 46
4.4. ATP Düzeylerinin Belirlenmesi....47
4.5. ATP Üretim Potansiyeli Analizi Sonuçları....48
4.6. Hasta ve Kontrol Grubu Arasında Delesyona Bağlı ATP, ATP Üretim Potansiyeli ve Laktat Seviyeleri Arasındaki Korelasyonun İncelenmesi....50
4.7. Hasta ve Kontrol Grubu Arasında mtDNA4977 Delesyonu/Mitokondri Kopya sayısı ile ATP, ATP Üretim Potansiyeli ve Laktat Seviyeleri Arasındaki Korelasyonun İncelenmesi 51
4.8. FTIR Sonuçları....54
4.9. FTIR Band Kayması 57
5. TARTIŞMA....61
KAYNAKLAR....67
HAM VERİLER....73
FORMLAR....74
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU....74
ETİK KURUL KARARI....76
PATENT HAKKI İZNİ....77
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI....78
ÖZGEÇMİŞ....79

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Yetişkinler, çocuklar ve adolesanlarda BKİ' ye göre andropometrik değerlendirme 4
Tablo 3.1: PZR Protokolü 34
Tablo 3.2: Reprodüktif yağ dokusunun FTIR spektrumlarında genel bant atamaları 42
Tablo 3.3: IR Spektral sınır değerleri 43
Tablo 4.1: Hasta ve kontrol gruplarının demografik verilerinin değerlendirilmesi.....40
Tablo 4.2: Hasta ve kontrol gruplarına ait MtDNA4977 delesyonu verileri 46
Tablo 4.3: Hasta ve kontrol gruplarına ait laktat seviyeleri.....47
Tablo 4.4: Hasta ve kontrol gruplarına ait ATP analizi sonuçları 48
Tablo 4.5: Hasta ve kontrol grubu ATP üretim potansiyelleri değerlendirilmesi 49
Tablo 4.6: MtDNA 4977 Delesyonu ile ATP, ADP, Laktat seviyeleri arasındaki korelasyon ilişkisi 50
Tablo 4.7: MtDNA 4977 Delesyonu / ATP, ADP, Laktat seviyeleri arasındaki korelasyon verileri.....50
Tablo 4.8: mtDNA4977 delesyonu/mitokondri kopya sayısı ile ATP, ADP, Laktat seviyeleri arasındaki korelasyon verileri 51
Tablo 4.9: mtDNA4977 delesyonu/ mitokondri kopya sayısı ile ATP, ADP, Laktat seviyeleri arasındaki korelasyon verileri 52
Tablo 4.10: Mitokondri kopya sayısı karşılaştırılması 53
Tablo 4.11: Lipid ve protein bant verileri.....55
Tablo 4.12: Yüksek delesyonlu ve düşük delesyonlu hastaların Lipid/Protein , Açil zincir uzunluğu, Doymamış/Doymuş Lipid oranı verileri.....56
Tablo 4.13: FTIR bant kaymalarının verileri.....59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Obezitede beden kitle endeksi verilerine göre popülasyon dağılımı……...5
Şekil 2.2: Yıllara göre obezite sıklığındaki artış……...7
Şekil 2.3: Obezitede Biyolojik Süreç……....8
Şekil 2.4: Obezitede yağ asidi oksidasyonu…….....9
Şekil 2.5: Obezitede hipoksinin etkileri…….……10
Şekil 2.6: Metabolik enerji salınımı ve yağ asitlerinin β-oksidasyonu ….……..12
Şekil 2.7: Mitokondride yağ aside oksidasyonu yoluyla enerji üretimi ……....…14
Şekil 2.8: Glukoz mekanizmasıyla enerji üretimi...……15
Şekil 2.9: Glukozdan laktat üretimi……...……16
Şekil 2.10: Metabolik gereksinimler için hayvan dokularında enerji kaynağı…..……...17
Şekil 2.11 : Mitokondride enerji üretim süreçleri……....18
Şekil 2.12 : Mitokondrinin yapısı……....19
Şekil 2.13: Mitokondri iç zarında oksidatif fosforilasyon aşamalarının şematik gösterimi…….....21
Şekil 2.14 : Mitokondriyal DNA…….23
Şekil 2.15 : Nükleer ve mitokondriyal DNA……...24
Şekil 2.16 : Mitokondriyal DNA delesyonları…….26
Şekil 2.17: Mt DNA mutasyon ve delesyonlarına bağlı görülen hastalıklar……...26
Şekil 2.18 : Solunum sürecinde delesyonu bağlı fonksiyon bozukluğu……..28
Şekil 2.19: MtDNA 4977 delesyonu……...29
Şekil 2.20: MtDNA delesyonlarının oksidatif fosforilasyona etkisi……...30
Şekil 2.21: MtDNA delesyonunun etkileri……..30
Şekil 3.1 : Spektral Parametreler…….40
Şekil 3.2 : ATR-FTIR spektroskopisi……..40
Şekil 3.3 : FTIR spektroskopisi bant dağılımı…….41
Şekil 4.1: Hasta ve kontrol grubuna dahil bireylerin mtDNA 4977 delesyon taraması, ortalama verilerin sonuçları ve delesyon yüzdelerinin dağılımı.....46
Şekil 4.2: Hasta ve kontrol grubuna dahil bireylerin ortalama laktat miktarları ve dağılımı 47
Şekil 4.3: Hasta ve kontrol grubunda ATP düzeylerinin dağlımı.....48
Şekil 4.4: Hasta ve kontrol grubunda ATP üretim kapasitelerinin dağılımı.....49

Şekil 4.5: mtDNA4977 delesyonu/kopya sayısı ile ATP düzeyleri arasındaki korelasyon 53
Şekil 4.6: Mitokondri kopya sayısı dağılımı.....54
Şekil 4.7: Toplam lipid değerlendirmesi.....56
Şekil 4.8: Toplam protein değerlendirmesi.....57
Şekil 4.9: Doymamış/Doymuş lipid oranı değerlendirmesi……57
Şekil 4.10: Doymamış lipid değerlendirmesi……58
Şekil 4.11 : Amid A normalizasyonuna göre C-H gerilme bölgesi (3030-2800 cm-1) ..60
Şekil 4.12: Amid 1 normalizasyonuna göre 1850-1000 cm-1 bölgesi……60

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
IDF	: Uluslar Arası Diyabet Federasyonu
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
ATP	: Adenozin Trifosfat
ADP	: Adenozin Difosfat
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
BKİ	: Beden Kitle İndeksi
BKO	: Bel-Kalça Oranı
TEMD	: Türkiye Endokrinoloji Ve Metabolizma Derneği
TURDEP	: Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Çalışması
KV	: Kardiyovasküler
HT	: Hipertansiyon
SYA	: Serbest Yağ Asidi
KoA	: Koenzim A
ETZ	: Elektron Transfer Zinciri
OXPHOS	: Oksidatif Fosforilasyon
TCA (TKA)	: Trikarboksilik Asit
Pi	: İnorganik Fosfor
FTIR	: Fourier Kızılötesi Dönüşümü

ÖZET

Tezol, A. (2019). Obezitede adipozit mitokondri fonksiyonu ve Laktat seviyesi üzerine mtDNA 4977 delesyonunun etkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD Doktora Tezi. İstanbul.

Dünya'da büyümesi hızla artan önemli rahatsızlıklardan biri obezitedir. Obezite fiziksel fonksiyonlardaki azalmanın dışında, birtakım metabolik rahatsızlıklara (kardiyovasküler hastalıklar, Tip 2 diyabet, hepatik yağlanma) öncülük etmesi ile ciddi risk grubu içerisinde yer almaktadır. Obezite ve Tip 2 diyabette mitokondriyal fonksiyonun belirgin şekilde azaldığı ve buna bağlı olarak oksidatif fosforilasyon mekanizmasının olumsuz etkilendiği bilinmektedir. Mitokondri enerji üretimi için önemli bir hücresel kaynak olup, nükleer ve mitokondriyal genomun yüksek koordinasyonu ile etkinliği sağlanmaktadır. Mitokondriyal DNA'nın nokta mutasyonları ve delesyonları temel olarak mitokondriyal solunum olmak üzere, hücresel ATP üretimindeki mekanizmaları etkilemektedir. Yağ dokusunda da ATP üretiminin çok önemli süreçler için etkili olduğunu dikkate alırsak, mtDNA 4977 delesyonunun yağ dokusunda mitokondri fonksiyonu ve metabolizması üstünde etkili olması beklenebilir. Dolayısıyla çalışmamızda, vücut kitle endeksi 35'in üzerinde olan obezite tanısı konmuş hastalarda yetersiz oksijenasyona bağlı olarak artmış olan laktat seviyelerinin ve hipoksi odaklarının mtDNA 4977 delesyonu ile bağlantısı araştırılmıştır. Bu amaçla, obez hastaların ve kontrol grubunun ATP ve laktat seviyelerinin ölçümü yapılmış ve eş zamanlı PZR yöntemi ile mtDNA 4977 delesyon taraması sağlanmıştır. Hasta ve kontrol grubunda lipid ve protein miktar, yapı ve fonksiyonel farklılıklarını değerlendirmek adına FTIR yöntemi uygulanmıştır. Obez hasta ve sağlıklı kontrol grubu laktat seviyeleri arasında anlamlı bir oranda farklılık saptanmasına ($p=0,001$) bunun mtDNA 4977 delesyonu ile bağlantılı olmadığı sonucuna varılmıştır. Yine hasta ve kontrol grubu ATP seviyeleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. ($p= 0,554$) FTIR tekniği ile lipid miktarı, yapı ve fonksiyon analizi yapılmış olup, hasta ve kontrol grubu arasında miktar olarak fark olmamasına rağmen, lipid yapı ve fonksiyonunun belirgin şekilde farklılaştığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Obezite, mtDNA 4977 delesyon, laktat, ATP, FTIR

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2017-25381

ABSTRACT

Tezol, A. (2019). Investigation of the effect of mtDNA 4977 deletion on adipocyte mitochondrial function and lactate level in obesity. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Medical Biology Branch, Doctorate Thesis. İstanbul.

Obesity is a global epidemic. Beyond the decrease in physical functions, obesity is in the serious risk group which causes metabolic disorders. It is known that mitochondrial function is significantly reduced in obesity and the OXPHOS mechanism is adversely affected. Mitochondria is an important cellular resource for energy production and its effectiveness is ensured by the increased coordination of the nuclei and mitochondrial genome. Spot mutations and delesions of mitochondrial DNA mainly affect mechanisms in cellular ATP production, mainly mitochondrial respiration. In our study, we investigated the connection of increased lactate levels and hypoxia levels with mtDNA 4977 degradation due to insufficient oxygenation in patients diagnosed with obesity. For this purpose, ATP and lactate levels of obese patients and the control group were measured and mtDNA 4977 deletion scanning was provided by simultaneous PCR method. FTIR method was applied to evaluate lipid and protein quantity, structure, functional differences in the patient and control group. It was concluded that there was a significant difference in the lactate levels ($p=0.001$) of obese patients and the healthy control group and this was not related to mtDNA 4977. Again, no significant difference was found in the ATP levels ($p= 0.554$) between patients and the control group. The FTIR technique analyzed lipid quantity, structure, function, and although there was no difference in quantity, especially between the patient and the control group, lipid structure, function were found to differ significantly.

Keywords: Obesity, mtDNA 4977 deletion, lactate, ATP, FTIR

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2017-25381

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Obezite, genetik ve çevresel faktörler tarafından etkilenebilen ve dünyada yaygın olarak görülen çok faktörlü hastalıklardan biridir. Obezitenin kardiyovasküler hastalıklar, tip-2 diyabet ve bazı kanser türleri gibi birçok hastalık ile yakın ilişkili olduğu bilinmektedir. Obezite, genel olarak bedenin yağ kütlesinin, yağsız kütleye oranının aşırı artması sonucu, boy uzunluğuna göre vücut ağırlığının normal sınırlarda beklenen düzeyin üstüne çıkması olarak tanımlanırken, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tanımına göre sağlığı bozacak şekilde vücutta yağ dokusunda ve/veya vücut yağ oranında artış olarak adlandırılır. (Barlow 2007, Ghouse 2016)

Obezlerde yapılan çalışmalarda yetersiz oksijenasyona bağlı olarak adipoz doku, laktat üretiminin artmış olduğu aktif bir bölgedir. Laktat yükselmesi hipoksi ile bağlantılı olarak gösterilmiştir. Düşük oksijenasyon obezitenin mekanik etkisi olarak tanımlanmıştır. (Chen 1994, Merwe 1999, Ye 2012)

MtDNA 4977 delesyonunun; yüksek oksijen tüketiminin olduğu dokularda yaşa bağlı olarak biriktiği bu delesyonla, Adenozin Trifosfataz (ATPaz)8 ve 6, COXIII, ND3, ND4, ND4L, ND5 genleri ile mitokondride protein sentezinde görevli 5 t RNA nın kodladığı mitokondriyal DNA bölgelerinin etkilendiği ve mitokondrideki oksidatif fosforilasyon metabolizmasının zarar gördüğü tespit edilmiştir. Deneysel çalışmalar delesyon artışı ile azalan Adenozin Trifosfat (ATP) üretimi ve artan laktat üretimi arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Çeşitli kanser modellerinde yapılan deneysel çalışmalar, delesyon artışı ile OXPHOS'nın etkilendiğini ve ATP'nin azaldığını göstermektedir. (Yusoff 2019) Bazı kanser tiplerine ait hücre soyları ile yapılan çalışmalar, kanserli hücrelerde oksidatif fosforilasyon azalmasına bağlı olarak laktat üretiminin ve çeşitli metabolik süreçlerin yönünün değiştiğini göstermektedir. Az da olsa literatürde, obez vakalardan elde edilen yağ dokusu hücrelerinde laktat düzeylerinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu bilgileri birleştirdiğimizde; obezlerde laktat üretiminin artışına neden olan bir mekanizmanın olabileceği, bunun mitokondrideki bir fonksiyon bozukluğuna bağlı olabileceği ve bununda 4977 delesyonu ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Diyabetik obezlerle yapılan çalışmalar, diyabetli hastalarda artan oksidatif stresin çeşitli dokularda

ilgili delesyonu arttırdığını göstermiştir.. Öte yandan diyabetik obezlerle yapılan çalışmalar metabolik hastalığa bağlı olarak dokuya özgü birtakım makromolekül içeriklerde farklılıklar olduğunu göstermiştir. Ancak literatürde, obezite ile ilişkili olarak adiposit dokuda bu delesyonun oluşup oluşmadığı, oluşuyorsa bunun adiposit hücresindeki mitokondri fonksiyonu ve hücre metabolizması ile ilişkisinin ne olduğu açık değildir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın amacı ;adipositlerde obezite ve Tip 2 diyabete bağlı olarak 4977 delesyonunun varlığını incelemek ve delesyonun bu hücredeki mitokondri fonksiyonu ile dokuya özgü makromolekül içerik, yapı ve fonksiyonu üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OBEZİTE

Obezite gelişmiş ülkelerde görülme oranı gün geçtikçe artan önemli metabolik rahatsızlıklardan biridir. Vücut kitle endeksi 30 kg/m²'nin üstünde olan hastalar obezite seviyesi yüksek grup içerisinde yer almakta olup, özellikle Kanada'da %14 olan obezite sıklığı son yıllarda %23 seviyelerine çıkmıştır. Obezite görülme sıklığının gün geçtikçe artması çok faktörlü olarak değerlendirilmesi gereken bir durumdur. Genetik yatkınlık obezite için önemli bir faktör olduğu kadar, günlük yaşamın kolaylıkları da (aşırı büyük porsiyon, aktivite kısıtlı yaşam) obezite riskini arttıran nedenler arasında çevresel faktörlerinde olduğunu göstermektedir. Obeziteyi anlamak için birçok faktörü bir arada değerlendirmek gerekmektedir; sosyoekonomik durum, çevre ve kişisel davranışlar ve genotip-fenotip ilişkileri önem taşımaktadır. Tüm bu etkenler ile termogenezdeki yağ asitlerinin depodan uzakta ve oksidasyona karşı yağ kullanımı ve adipoz olmayan dokulara karşı bölgesel yağ depolarında kademeli olarak yağların depolanması söz konusudur. Vücut ağırlığının ve bileşiminin kontrolü; enerji alınması, enerji harcanması ve yağ depolanması gibi mekanizmalar ile sağlanmaktadır. Tüm bu mekanizmalar, farklı nöropeptidlerin ve hormonların katıldığı nöral ve hormonal sistemlerin bütünsel bir katkısı ile fonksiyon görmektedir. (Serra 2013, Kaila 2008, Hoffstendt 2010)

Obezite, vücutta aşırı yağ birikimi ile gelişir ve yüksek enerji alımına sekonderdir. Vücut yağ yüzdesini belirlemek kolay olmadığı için obezite, aşırı yağdan ziyade aşırı kilo olarak tanımlanmaktadır. Obezite tanım ve derecelendirmesinin beden kitle indeksi (BKİ)'ne dayanarak "BKİ=Ağırlık (kg)/Boy (m2)" formülü ile değerlendirilir (TEMD 2019). BKİ' ye göre yetişkin, çocuk ve adolesanlarda zayıf, normal ve fazla kiloluluk ile genel olarak obezite ve dereceleri aşağıda (Tablo 2.1) gösterilmiştir.

Tablo 2.1: Yetişkinler, çocuklar ve adolesanlarda BKİ' ye göre andropometrik değerlendirme.*

Gruplar	Yetişkinler (BKİ, kg/m^2)	Çocuk ve Adolesanlar BKİ-Z skoru (SD)	Çocuk ve Adolesanlar BKİ-persantil
Zayıf	<18,50	<-2.00 SD	<%5
Normal	18,5 – 24,99	-2.00 – 1.00 SD	≥%5 ile <%85 arasında
Fazla kilolu	25,00 – 29,99	1.01 – 2.00 SD	≥%85 ile <%95 arasında
Obez	≥30,00	>2.00 SD	≥%95
Hafif obez	30,00 – 34,99	-	95. persantile karşılık gelen BKİ'nin %100-120'si
Orta derecede obez	35,00 – 39,99	-	95 persantile karşılık gelen BKİ'nin %120-140'ı
Morbid obez	40,00 – 49,99	-	95 persantile karşılık gelen BKİ'nin >%140'ı
Süper obez	≥50,00	-	

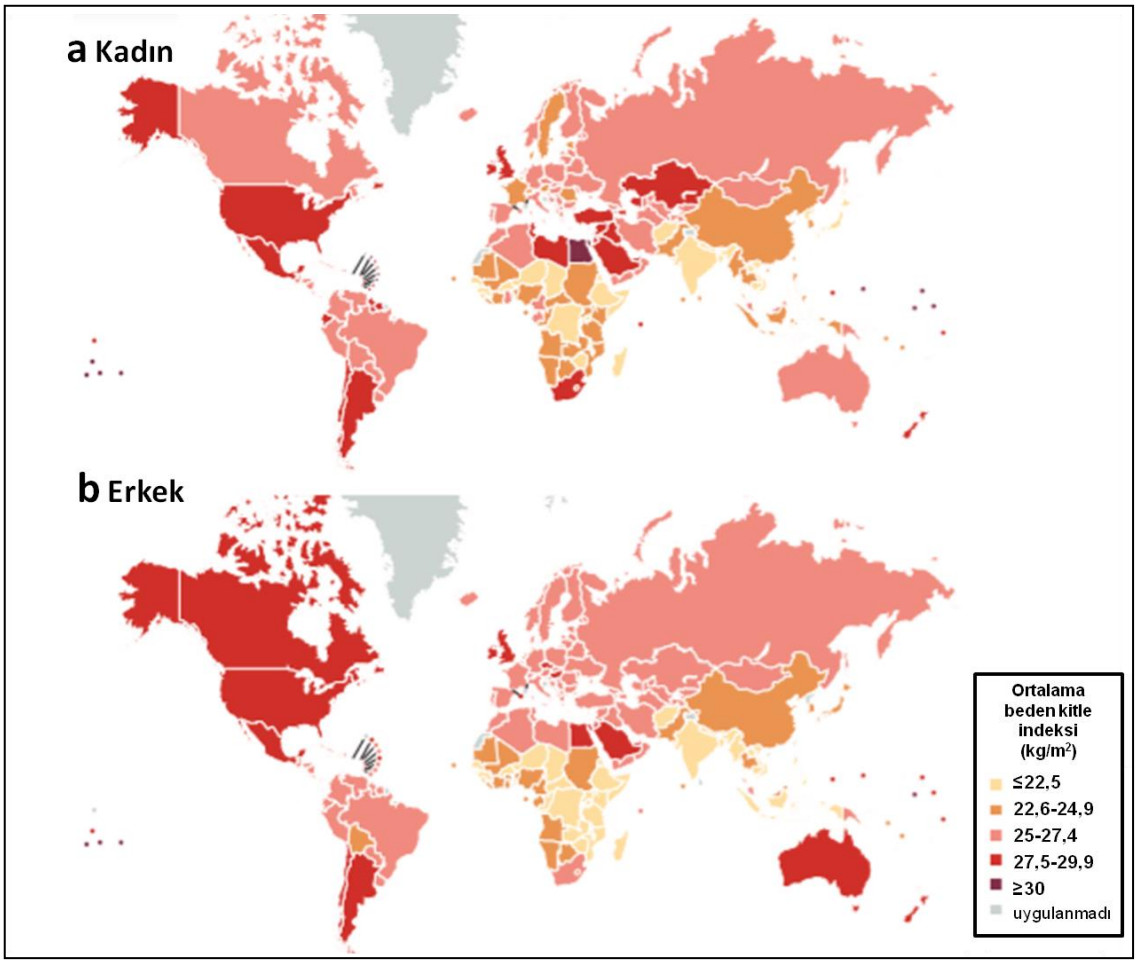
*: Tablo Türkiye Endokrin ve Metabolizma Derneği 2019 Obezite Tanı ve Tedavi Kılavuzundan alınmıştır.

2.2. EPİDEMİYOLOJİ

2.2.1. Dünyada ve Türkiye'de Obezite

Dünya üstünde birçok insan tarafından 21.yüzyılın salgını olarak isimlendirilen obezite; genellikle hafif, kronik, sistemik enflamasyonun eşlik ettiği aşırı miktarda yağ dokusu birikimi ile oluşan orantısız vücut ağırlığı olarak tanımlanmaktadır. Obezite tek başına hasta yaşam kalitesini olumsuz etkileyen hastalıklardan biri olmasının yanında Tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, bazı kanser türleri ve diğer olumsuz patolojik durumların gelişmesi ile de ilişkilendirilen bir rahatsızlıktır. Bu saymış olduğumuz patolojik durumlardan bazıları obezite için bir özellik olarak kabul edilebilir. Hasta verileri incelendiğinde, obezitenin kardiyovasküler hastalıklar ve Tip 2 diyabet için yaygın bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir. (Blaak 2003) Termodinamiğin ilk yasasına göre; artmış yağ depolanması, kalori alımı ve enerji harcanması arasındaki dengesizlik sonucu oluşmaktadır. Obezite çalışmalarında karşılaşılan en büyük zorluk obeziteye sahip bireylerin birbirlerine karşı olan belirgin farklılıklarıdır. Obezite tanısı konmuş kişilerin vücutlarında yağ dokusunun yerleşim yeri ve vücut şeklini etkilemesi önemli bir ayırıcı göstergedir. Örneğin kalça ve uyluk bölgelerinin çevresinde aşırı deri altı yağ dokusu biriken kadınlarda armut benzeri vücut yapısının olması, karın bölgesinde yağ dokusu

birikimi ile oluşan elma benzeri vücut şekli ya da iç organların çevresinde yağ dokusu birikiminin oluşması bu farklılıkların bazılarıdır. İç organların yağlanması erkeklerde daha sık rastlanan bir durum olup, kardiyovasküler riski ciddi anlamda etkilemektedir.

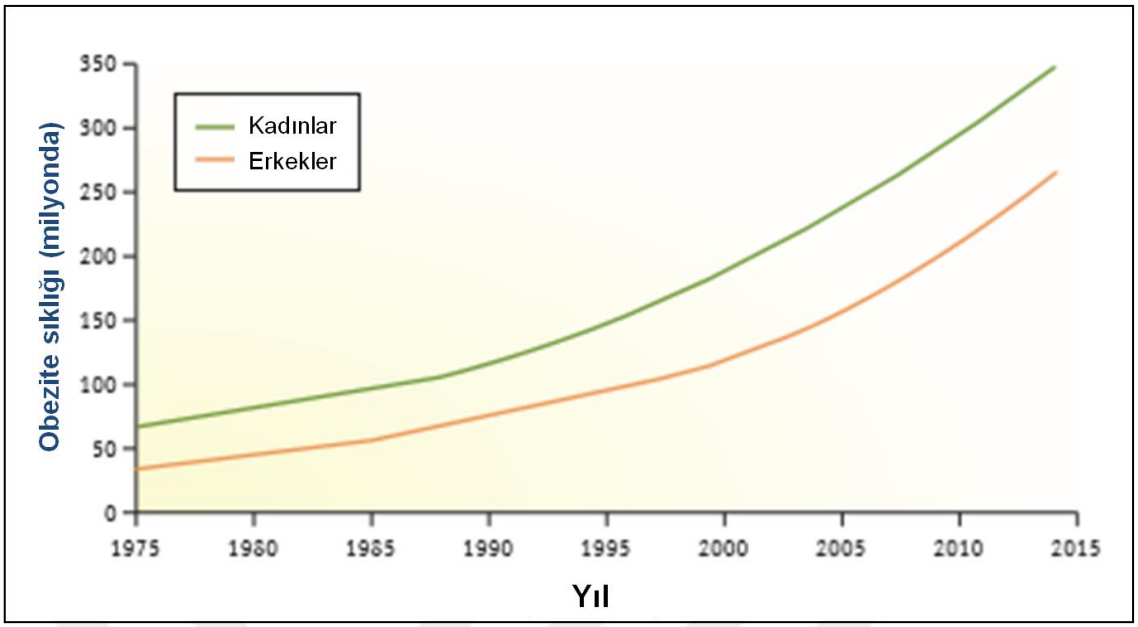


Şekil 2.1: Obezitede beden kitle endeksi verilerine göre popülasyon dağılımı (Munsela 2017'dan modifiye edilmiştir)

Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) verilerine göre 2014 yılında 1,5 milyar kilolu ve 640 milyon obez yaşarken bu oran şu anda obez ya da aşırı kilolu olarak yetişkinlerde 2,1 milyardan fazladır. Obezitenin cinsiyete göre 2014 yılında belirlenen yaklaşık yaş standardize sıklığı (popülasyonları farklı yaş profilleriyle karşılaştırmak için kullanılan bir epidemiyolojik Teknik) yetişkin erkeklerde %10,8 ve yetişkin kadınlarda %14,9'dur. Bu veriyi değerlendirdiğimizde, obezite riskinin kadınlarda erkeklere göre daha yüksek olduğu ve özellikle erkeklerde fazla kilolu olmaya yatkınlığın daha fazla olduğunu söyleyebiliriz. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan araştırmalarda, Afrikalı

Amerikalılar diğer etnik gruplara göre daha yüksek aşırı obezite sıklığına sahiptir. Diğer bir etnik grup olarak Asya popülasyonunu incelediğimizde, bu grubun BKİ değerleri beyaz bireylere göre daha düşük olup, bu kişilerde organ çevresinde yağ birikimine yatkınlık daha yüksek bulunmuştur. Yine Asya popülasyonunda beyaz ırktan farklı olarak daha düşük BKİ seviyeleri ile Tip 2 diyabet gelişim oranı daha yüksek bulunmuştur. 1980 ve 2008 aralığında BKİ için belirtilen standartlaşmış ortalama, her on yılda erkeklerde 0,4, kadınlarda 0,5kg/m² yükselmiştir. BKİ verileri 1980-2013 yılları arasında ortalama veriler baz alınarak incelendiğinde; >25kg/m² olan yetişkinlerin yüzdesi yıllara göre erkeklerde %28,8'den %36,9'a, kadınlarda %29,8'den %38'e yükselmiştir. Obezite sıklığının gelecek kuşaklara aktarılma oranının her geçen yıl hızla büyüyeceği ve 2030 yılı itibarıyla Dünya'daki yetişkin nüfusun %57,8'inin (3,3 milyar kişi) BKİ' sinin 25kg/m² veya daha yüksek olacağı tahmin edilmektedir. (Ghouse 2016, Munsela 2017)

Türkiye'de beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler, hareketsiz yaşam gibi nedenler başta obezite olmak üzere ciddi metabolik hastalıkların görülme oranını arttırmaktadır. Bölgesel olarak incelediğimizde, Doğu Anadolu bölgesinde obeziteye rastlanma oranı Türkiye'nin diğer bölgelerine göre daha düşük olup; Bursa, İstanbul, Ankara, Konya obezite sıklığının son 12 yılda ciddi artış gösterdiği illerdir. 1998-2010 arasında obezite sıklığı %22,3'den %31,2'ye yükselmiştir. 2010 yılında tamamlanan 'Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması'na ' göre 18 yaş üstü yetişkinlerde obezite sıklığı %30,3 (kadınlarda %41, erkeklerde %20,5), morbid obezite sıklığı %2,9 (kadınlarda %5,3, erkeklerde %0,7)'dür. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerini incelediğimizde, 2016 yılı sonuçlarına göre Türkiye Avrupa'da obezite sıklığının en yüksek olduğu ülke olup, obez bireylerin sayısı 16 milyonu geçmiştir. Hazır yiyeceklere ilgisi yüksek bir grup olan çocuklarda obezite gün geçtikçe artan boyutlarda gözlenen ciddi bir metabolik rahatsızlık olmakta, ülkemizde son yıllarda %10'un üzerinde bir sıklıkta obezite çocuklarda gözlenmektedir.

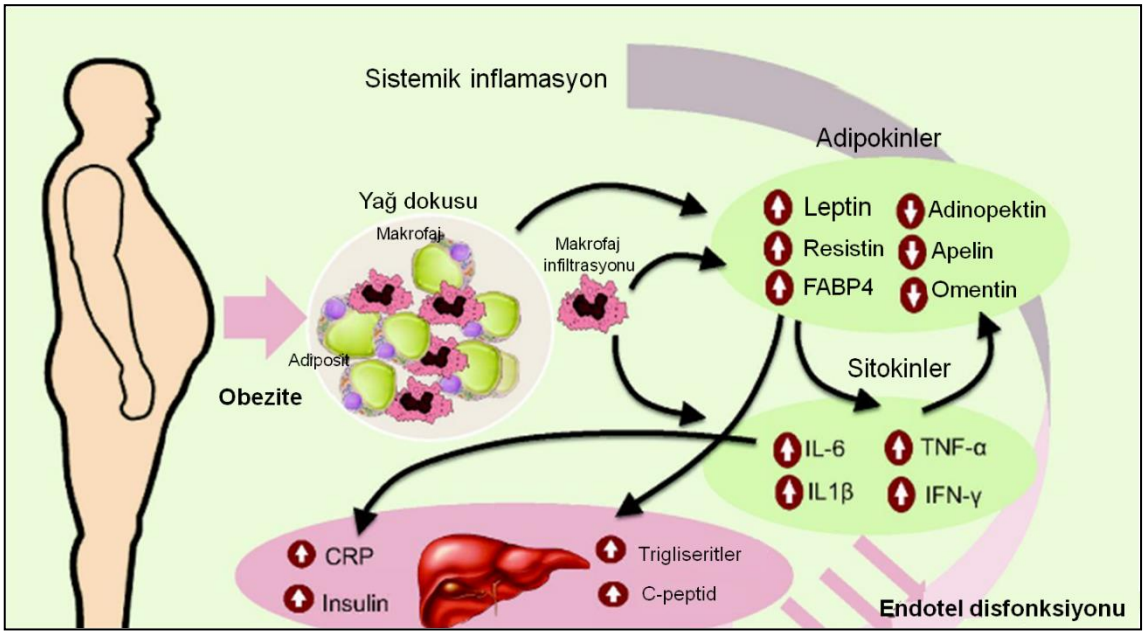


Şekil 2.2: Yıllara göre obezite sıklığındaki artış

2.3. OBEZİTE PATOGENEZİ

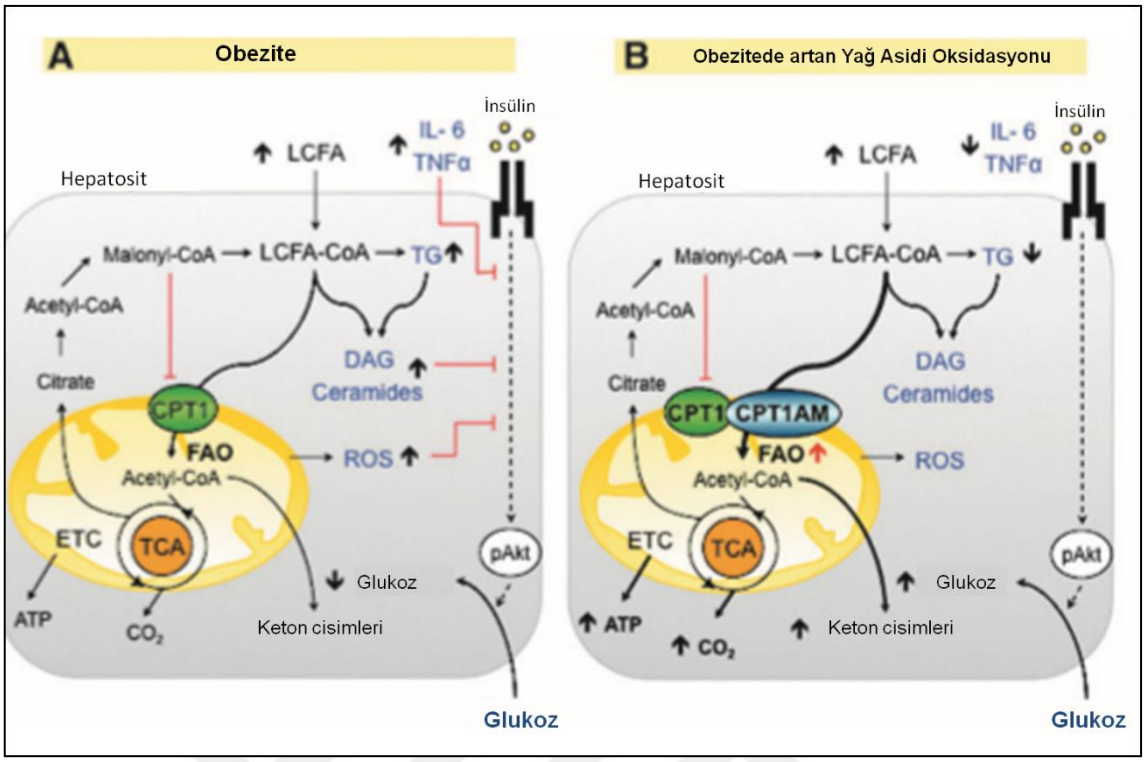
Yağ dokusu aşırı yağ birikimi durumlarında bu yağları depolayamadığında, lipitler karaciğer, kas, pankreasta uygunsuz şekilde birikirler. Esas olarak bakıldığında, diasilgliserollerin (DAG) aracılık ettiği bu lipotoksik ortam sonucu, doğru glukoz taşınması ve insulin sinyalleşmesi de engellenmektedir. Bu nedenle, yağ asitlerinin hücre içine girişini engelleyecek, yağ aside oksidasyonunu (FAO) uyarabilecek ve diacilgliserollerin trigliseridlere dönüşmesini sağlayabilecek bir düzenleme ile insulin direncinin önlenmesi planlanmaktadır. Obeziteye bağlı insulin direncinin patofizyolojisini detaylı incelediğimizde, adiposit hasarına bağlı dolaşımda ve dokularda inflamasyon artışı ve immun hücrelerin salınması söz konusudur (Şekil 2.3). Yağ adipoz dokuda birikir ve adipositler sağlıklı boyutlarını aşarlar. Bu durumda adipokinler olarak isimlendirilen moleküller ve inflamasyon sitokinlerinin salınımı obeziteye bağlı inflamatuar sürecin başlamasına neden olur. Aynı zamanda yağ dokusunda yağların aşırı birikmesi adiposit hipoksisi dediğimiz oksijenden yoksun doku oluşumuna da neden olur. Obeziteye bağlı enerji dengesizliği, hem hipertrofi hem de hiperplazi gösteren adipositlerde aşırı enerjinin depolanmasına neden olur. Adipoz hiperplazi ve hipertrofi durumu hücre içinde normal dışı adiposit fonksiyonuyla ilişkilidir. Adipositlerin fonksiyonel farklılaşmalarının dışında, obezitede görülen bir başka etkileri de diğer yağ dokusu hücreleri (özellikle makrofajlar, sitokinler, hormonlar) üstündeki etkileridir. Vücut yağ kütlesi ile orantılı konsantrasyonlarda dolaşımda bulunan adiposit hormon

leptin, obezite ve enerji dengesi arasındaki ilişki açısından önemli bir hormondur. Yapılan araştırmalar göstermektedir ki; obezite sadece aşırı yağ birikiminden kaynaklı olmayıp, aynı zamanda vücutta enerji dengesini sağlayan sistemin bozukluğuna da bağlıdır. Enerji metabolizmasında meydana gelen süreci incelediğimizde, serbest yağ asitleri vücutta arttığında bunlar glukoz fosforilasyonu, oksidasyonu ve iskelet kaslarına glukozun aktarılmasını engellemektedirler. (Olszewska 2018).(Şekil 2.4)



Şekil 2.3: Obezitede Biyolojik Süreç (Aleksandrova 2018'dan modifiye edilmiştir)

Obezite gelişmesini belirleyen genler arasında, melanokortin 4 reseptörü (MC4R), β3-adrenerjik reseptör (ADRB3), proprotein konvertaz subtilisin kexin 1 (PCSK1), beyin kaynaklı norotrofik faktör (BDNF), laktaz (LCT), melatonin reseptör 1B (MTNR1B), toll like reseptör 4 (TLR4), ekonukleotid pirofosfataz/fosfodiesteraz 1(ENPP1), fibroblast büyüme faktörü reseptör 1(FGFR1) ve leptin/leptin reseptörü (LEP/LEPR) vb. olduğu gösterilmiştir (Genom- Wide Association Studies: GWAS).



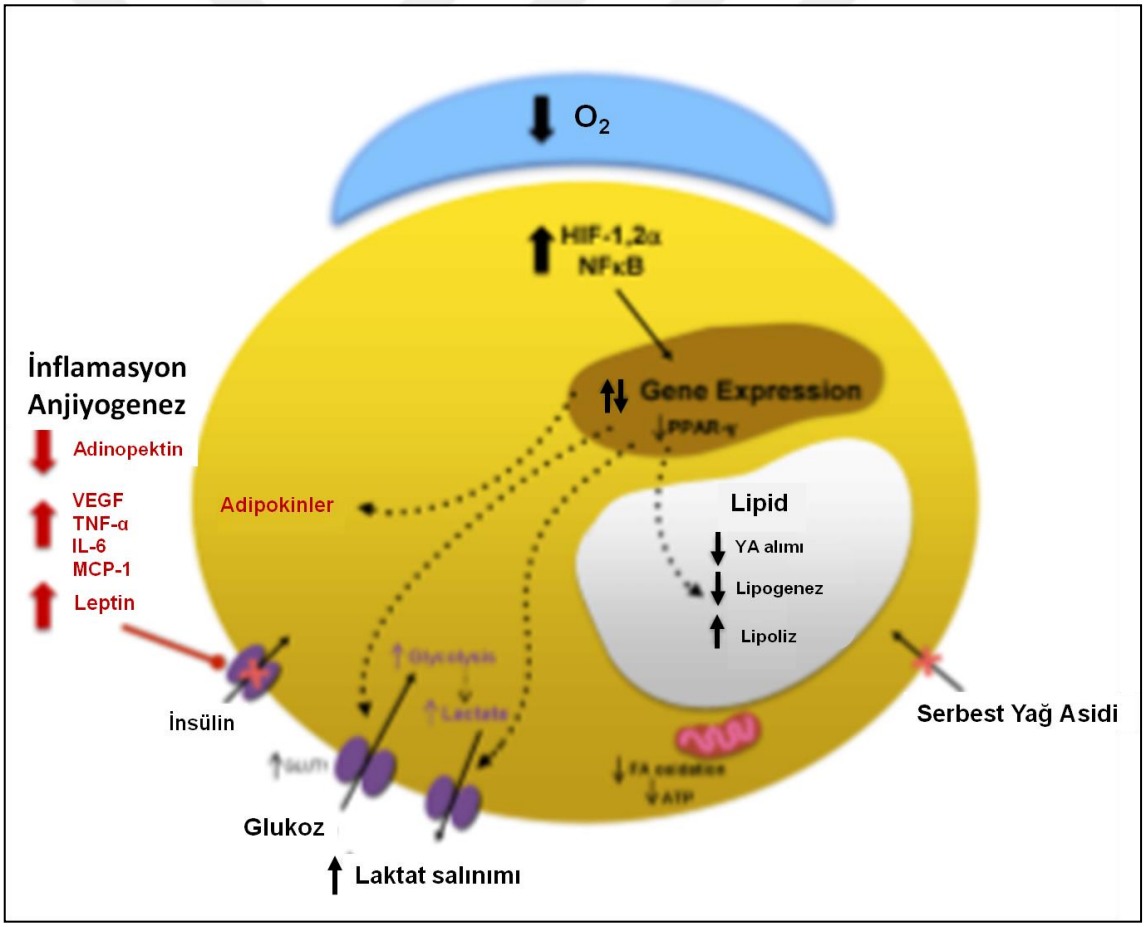
Şekil 2.4: Obezitede yağ asidi oksidasyonu (Serra 2013'den modifiye edilmiştir)

2.3.1. Obezite Ve Hipoksi Metabolizması

Obezite, diğer patolojik durumlar ile ilişkilendirildiğinde insulin direnci ve tip 2 diyabet riskinde artış ile karakterize olan bir hastalıktır. Bu riskler, yağ dokusunun kronik enflamatuar cevabı ile ilişkili olarak glukoz ve lipid metabolizmasını etkiler. Hipoksi obezlerde yetersiz adipoz doku kan akımından kaynaklı olup, enflamatuar cevaba önemli bir katkısı olduğunu söyleyebiliriz. Glukoz alımı, glikoliz, lipid metabolizması, enflamasyon ve anjiogeneze neden olan gen ekspresyonundaki değişiklikler hipoksiye verilen cevabın önemli bir göstergesidir. Adipokinler ve inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunda meydana gelen hipoksi ile ilişkili değişiklikler adipoz doku sinyalizasyonundaki değişikliklere bağlanabilir. Obeziteye bağlı olarak oluşan beyaz adipoz doku birikiminin doku hipoksisine neden olan önemli bir etken olduğunu söyleyebiliriz. Obez adipoz doku ortalama olarak yağsız adipoz dokudan üç kat daha düşük bir oksijen seviyesine sahiptir. Yağ doku miktarı arttıkça, doku oksijenasyon ihtiyacını karşılayamaz ve bunun sonucunda hipoksi kronik bir duruma dönüşebilir.

Hipoksiye karşı adipoz dokunun cevabını değerlendirdiğimizde, iki ana transkripsiyon faktörünün etkili olduğunu görürüz. Bunlardan biri hipoksi ile uyarılan faktör (HIF) ve diğeri nükleer faktör kB (NFkB)'dir. Bu transkripsiyon faktörleri

enflamatuar ve anjiyojenik adipokinlerin ekspresyonunu arttırır, bunun sonucunda glukoz alımı, glikoliz ve insulin duyarlılığını etkileyen proteinlerin ekspresyonu artar. Normalde yağ dokusunda lipoliz uyarılmış olup, insulin seviyeleri düşük ve epinefrin seviyeleri yüksektir. Epinefrin adenilat siklazı aktive eden ve cAMP üreten hücre zarı beta adrenerjik reseptörlere bağlanır, protein kinaz A'nın aktivasyonu hormona duyarlı lipazların fosforilasyonuna öncülük eder ve bu da serbest yağ asitlerinin ve monogliserollerin oluşumunu kolaylaştırır. Serbest yağ asitlerinin birikmesi ile birlikte glukoz kullanımı azalır ve daha çok glukoz alımı için gerekli olan sinyalizasyonu serbest yağ asitleri bloke eder. Hipoksinin etkisiyle obezitede lipid metabolizmasının normal düzeni bozulmuştur. Belirgin adipoz hipoksisi olan obezlerde serbest yağ asidi alımı azalmış, lipoliz artmıştır (Şekil 2.5). (Lounsbury 2016, Schwartz 2017, Vernochet 2012)



Şekil 2.5: Obezitede hipoksinin etkileri (Lounsbury 2016'dan modifiye edilmiştir.)

2.4. YAĞ ASİDİ OKSİDASYONU

Lipitler memeli organizmalarında metabolik öneme sahiptirler ve trigliseroller, fosfolipidler, steroidler ile birlikte keton cisimleri, gliserol, uzun zincirli yağ asitleri gibi onların metabolik ürünlerini içerirler. Yağ asitleri vücutta en büyük enerji kaynağıdır. Protein ve karbonhidratlar ile karşılaştırıldığında yaklaşık iki kat daha fazla enerji sağlarlar. Yağ asidi oksidasyonu ile kalp, karaciğer ve beyin de dâhil olmak üzere birçok organ ve dokunun enerji ihtiyacını karşılamakta ve uzun süreli açlık dönemlerinde enerji sağlayıcı etkileri daha da önem kazanmaktadır. (Halberg 2009, Wakil 2009)

Yağ asitleri oksidasyonu çeşitli dokularda gerçekleşen öncelikli metabolik süreç olup, glukoz yoksunluğunda önemi artmaktadır. Farklı organlarda yağ asidi oksidasyon süreci ile enerji üretimi değişkenlik göstermektedir. Örneğin karaciğer, iskelet kası gibi birtakım organlarda yağ asidi oksidasyonu hücresel enerji ihtiyacının %75'inden fazlasını sağlarken, kalp dokusunda durum farklılık gösterip enerji ihtiyacı yağ asidi oksidasyonu ile sağlanmaktadır. Mitokondriyal β-oksidasyon yağ asidi yıkımının ilk yolu olarak karşımıza çıkmaktadır. β-oksidasyon sürecinde, uzun zincirli yağ asitleri açil karnitine dönüştürülerek mitokondri içine taşınmaktadır. (Takamura 2008)

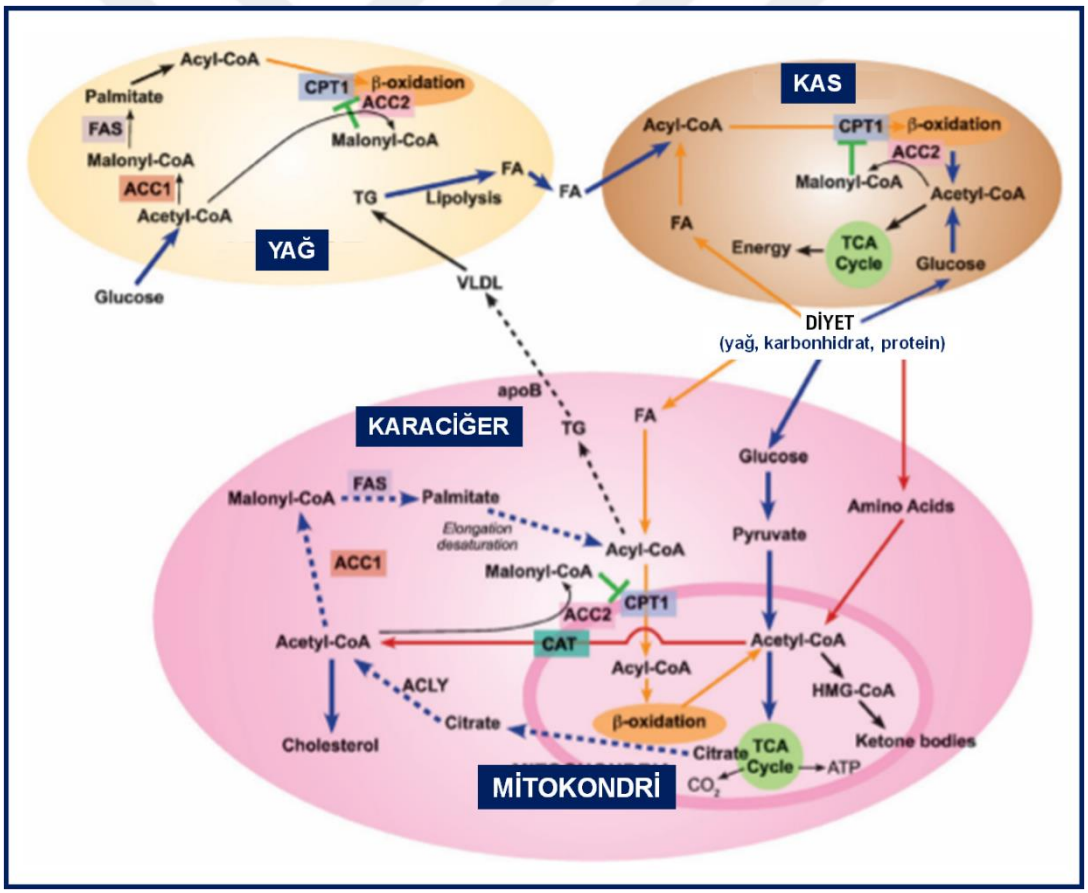
Yağ asitlerinin oksidasyon ve biyosentez mekanizması farklı organellerde gerçekleşmekte olup, oksidasyonu mitokondride biyosentezi sitozolde meydana gelmektedir. Asetil Koenzim A (KoA) yağ asidi oksidasyon sürecinin son üretimi, aynı zamanda sentezinin de başlangıç ürünü olarak döngüde yer almaktadır. Yani tüm yağ asidi oksidasyon ve biyosentez süreçleri değerlendirildiğinde, Asetil KoA bütün yolların geçtiği önemli bir basamaktadır. Asetil KoA mekanizmada ortak kaynak olarak rol oynamakta olup, glukoz yıkımı, yağ asitlerinin oksidasyonunun ve amino asitlerin yaklaşık olarak yarısının son ürünü olarak karşımıza çıkmaktadır. Bazı metabolik olaylarda örneğin yağ asidi sentezinde ve hormon sentezinde ise başlangıç molekülü olarak süreçte yer almaktadır. (Karpe 2011)

Yağ asidi oksidasyonu dört bileşenden meydana gelmektedir. Karnitin döngüsü, β-oksidasyon döngüsü, elektron transfer yolu ve keton cisimlerinin sentezi.

Ekzojen ve endojen kaynaklı uzun zincirli serbest yağ asitleri sitozolde onların koenzim A esterlerine doğru aktive edilir ve bu yağ açil KoA'lar karnitin siklusu yoluyla

yağ açil karnitinler olarak mitokondri içine girerler. Tüm bu uzun zincirli yağ asitlerinin dönüşümüne karşılık orta ve kısa zincirli yağ asitleri doğrudan mitokondriye girer ve mitokondri matriksinde KoA türevlerine doğru aktive edilir.

Mitokondriyal yağ asitlerinin β-oksidasyonu özellikle açlık, uzun süreli açlık veya düşük yoğunluklu egzersiz sırasında enerji üretiminde rol oynamaktadır. Oksidasyon için gerekli olan yağ asitlerinin iki kaynağı vardır. Bunlardan biri diyet, diğeri ise adipoz dokunun adipositlerinde depolanan trigliserollerin hareket kazanmasıdır. Karmaşık bir bağlantılı kaskadlar dizisi tarafından kontrol edilen yağ asitleri formunda metabolik enerji salınımı enerji ihtiyaç döngüsünde önemli bir süreci oluşturmaktadır. Yağ asitleri bir kez salındıktan sonra β-oksidasyon yolunda enerji sağlayacakları kas gibi diğer dokulara geçerler (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 : Metabolik enerji salınımı ve yağ asitlerinin β-oksidasyonu (Wakil 2009'dan modifiye edilmiştir)

Mitokondri enerji üretim yolunda yağ asidi oksidasyonu için gerekli tüm enzimleri içermektedir. Burada mitokondri hücresel enerjinin en önemli organeli olup, plazma

serbest yağ asitleri ya da trigliseridler ile ilişkili lipoproteinlerin oksidasyonunda ana bölge olarak fonksiyon görmektedir. Elektron transfer yolu, β- oksidasyonda salınan enerjinin bir kısmını solunum zincirine aktarır, bu da ATP'nin sentezlenmesine neden olur. Karaciğerde yağ asidi β-oksidasyon döngüsünden elde edilen asetil KoA'nın çoğu, iki yapının sentezinde kullanılmaktadır. Bunlardan biri 3-hidroksibütirat diğeri asetoasetal cisimleridir.

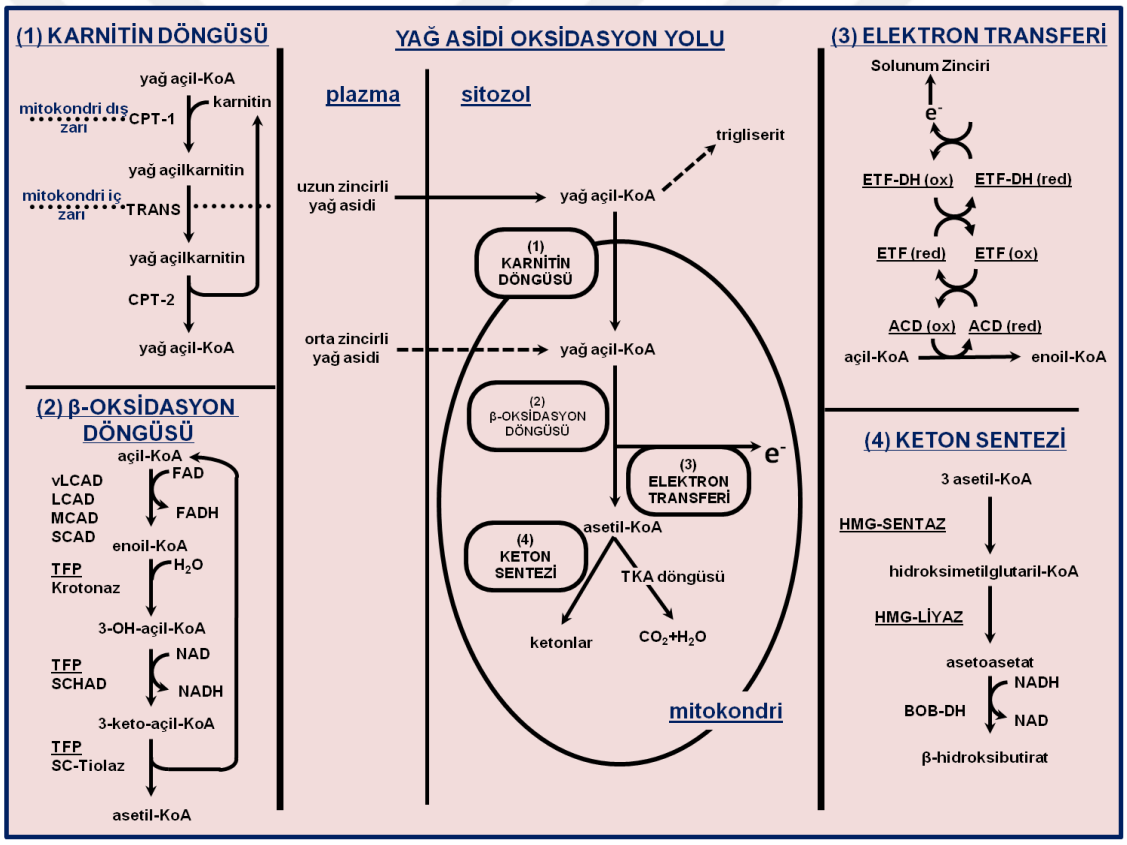
Ökaryotik hücrelerde yeterli enerji üretimi için üç mitokondriyal yol gerekmektedir; Elektron transfer zinciri (ETZ), yağ asidi β oksidasyonu (YAO) ve trikarboksilik asit siklusu. Elektron transfer zinciri iç mitokondriyal membran süper kompleksinde organize olmuştur ve substrat kanalizasyonunu ve katalitik etkinliği destekler. Daha önce yapılan çalışmalarda yağ asidi oksidasyonu ve elektron transfer zinciri arasında fonksiyonel etkileşim gösterilmiş olsa da herhangi bir fiziksel etkileşim belirtilmemiştir.

Yağ asidi oksidasyon sürecinin incelendiğimizde, iki ana bileşenin etkili olduğunu görmekteyiz. Bunlardan biri, substratların mitokondri içine transferini sağlayan karnitin palmitoil transferaz I ve II'dir ki bir karnitin asilkarnitin translokaz vasıtasıyla bağlanır. Diğeri ise, bir katabolik β-oksidasyon enzimatik sarmalıdır ki, çok uzun zincir KoA dehidrogenazı kapsayan uzun zincir bileşenlerini ve mitokondriyal üçlü fonksiyonel proteini içerir (TFP).

Yağ asitleri oksidasyon reaksiyonuna girmeden önce mutlaka yağ asidi 'açil KoA sentetaz (tiyokinaz) enzimi tarafından aktive edilirler. Bu reaksiyon sırasında ATP ve Koenzim A kullanılır ve açil KoA aktif molekülü oluşur. Tiyokinaz enzimi endoplazmik retikulum, peroksizom ve mitokondrilerde yerleşik olarak bulunur. Uzun zincirli yağ asitleri mitokondri içerisine karnitin palmitoil transferaz enzimi aracılığıyla geçerler. Bu enzimlerden karnitin palmitoil transferaz-I (CPT-1) enzimi aktive olmuş açil KoA moleküllerini açilkarnitine dönüştürür. Açilkarnitinin en önemli özelliği mitokondri iç zarından geçip mitokondriye gelebilmesidir. Mitokondri içine geçtikten sonra açilkarnitin molekülleri tekrar Karnitin palmitoil transferaz II (CPT-II) aracılığıyla tekrar açil KoA şekline dönüştürülmelidir. (Prakash 2018)

Oksidasyon reaksiyonu açil KoA'lar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Yağ asidi oksidasyonu esas olarak tüm bu aşamaları geçen yağ asitlerinin yıkılarak enerji elde

edilmesi olayıdır. Özellikle uzun süreli açlık ve diyabet durumlarında yağ asidi oksidasyonunda yani yıkımında artış gözlenmektedir. Başta da belirttiğimiz gibi, yağ asitlerinin β-oksidasyonunda açil KoA moleküllerinden ikişer karbon atomlu parçalara ayrılarak yağ asitleri yıkıma uğramakta ve son ürün olarak asetil KoA molekülleri oluşmaktadır. Yağ asitlerinin asetil KoA'ya dönüşümü esnasında FADH2 ve NADH molekülleri üretilmektedir. Bu FADH2 ve NADH molekülleri elektron transport zincirinde ADP'den ATP oluşumunda öncüdür. Yağ asitlerinin son ürünü olan asetil KoA ise sitrik asit döngüsü aracılığıyla yükseltgenerek ATP elde edilmesini sağlamaktadır. Elektron taşınmasından elde edilen enerji proton gradiyentinde depo edilir ve bu enerji ile ATP sentezlenir (Şekil 2.7).

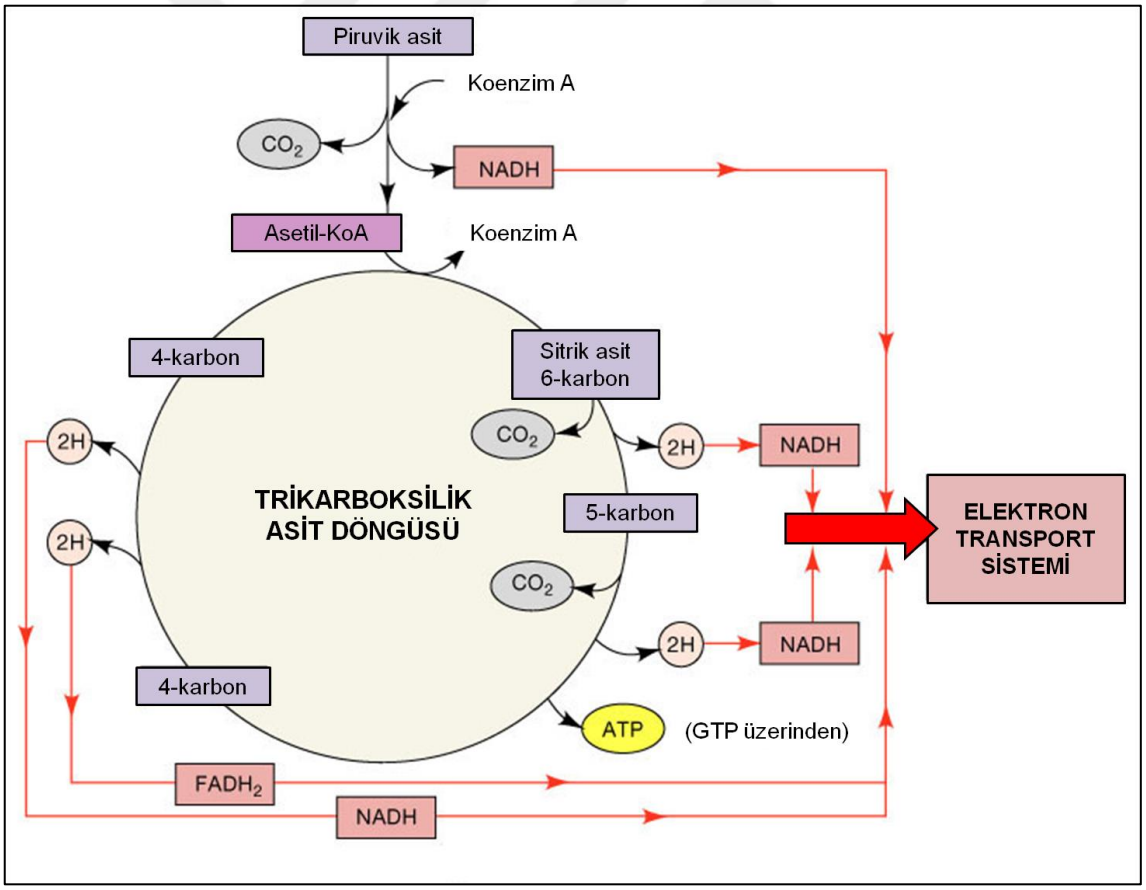


Şekil 2.7 : Mitokondride yağ asidi oksidasyonu yoluyla enerji üretimi

Yağ asidi oksidasyon mekanizmasındaki birtakım bozukluklar, hipoglisemi gibi metabolik hastalıkların sıklığını arttırmaktadır. (Serra 2013, Sharpe 2018)

2.5. GLİKOLİZ MEKANİZMASI-LAKTAT SENTEZİ

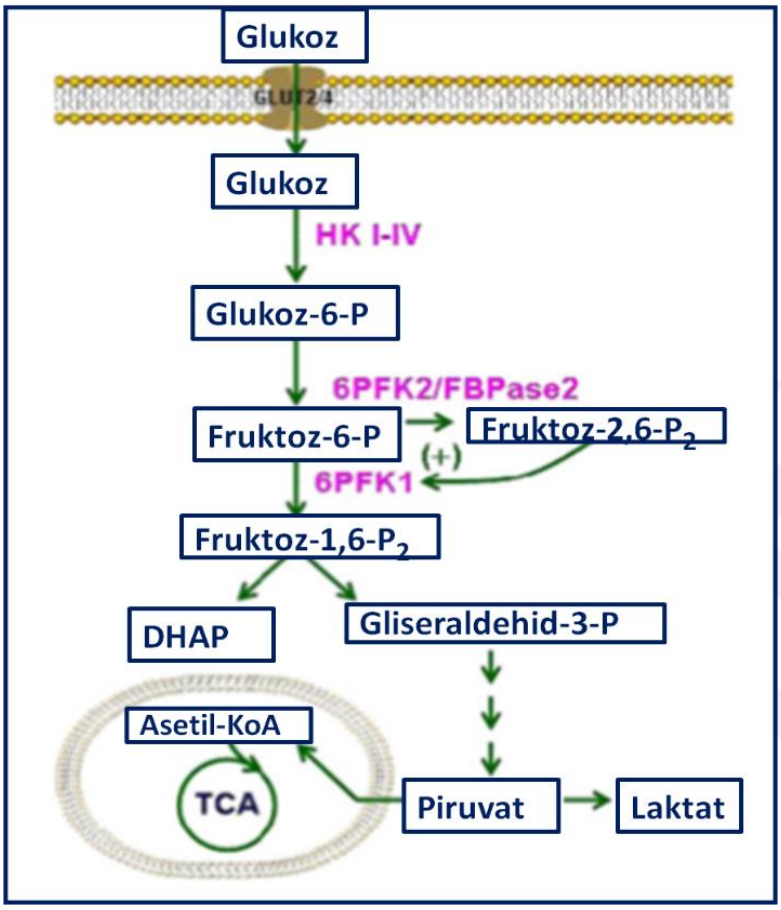
Enerji üretim mekanizmasının ana kaynağı olan glukoz'un enerji sağlamak için (ATP ve NADH2) pirüvata kadar yıkılması olayı glikoliz olarak isimlendirilmektedir. Glikoliz hücrelerin sitozolünde meydana gelmektedir. Ana enerji kaynağı olarak aerobik solunum kullanan hücrelerde glikoliz yoluyla oluşan pirüvat sitrik asit siklusunda kullanılmakta ve oksidatif fosforilasyon ile karbondioksit ve suya okside olmaktadır. Hücreler oksidatif fosforilasyonu kullansalar bile, glikoliz oksidatif fosforilasyondan önce enerji için acil bir yedekleme ve hazırlık aşaması olarak etkili olmaktadır. Yüksek oksijen ihtiyacı olan dokularda (örneğin kalp) pirüvatın üretimi asetil KoA sentezi için önemlidir, aynı zamanda laktat, alanin ve oksaloasetatın öncüsü olarak da gerekli olduğunu belirtmek gerekmektedir. Glukozun oksidasyonu ile ADP'nin 2 molekülü ATP' ye ve NAD'nin 2 molekülü NADH'a dönüşmektedir (Şekil 2.8). (Phypers 2006)



Şekil 2.8: Glikoliz mekanizmasıyla enerji üretimi

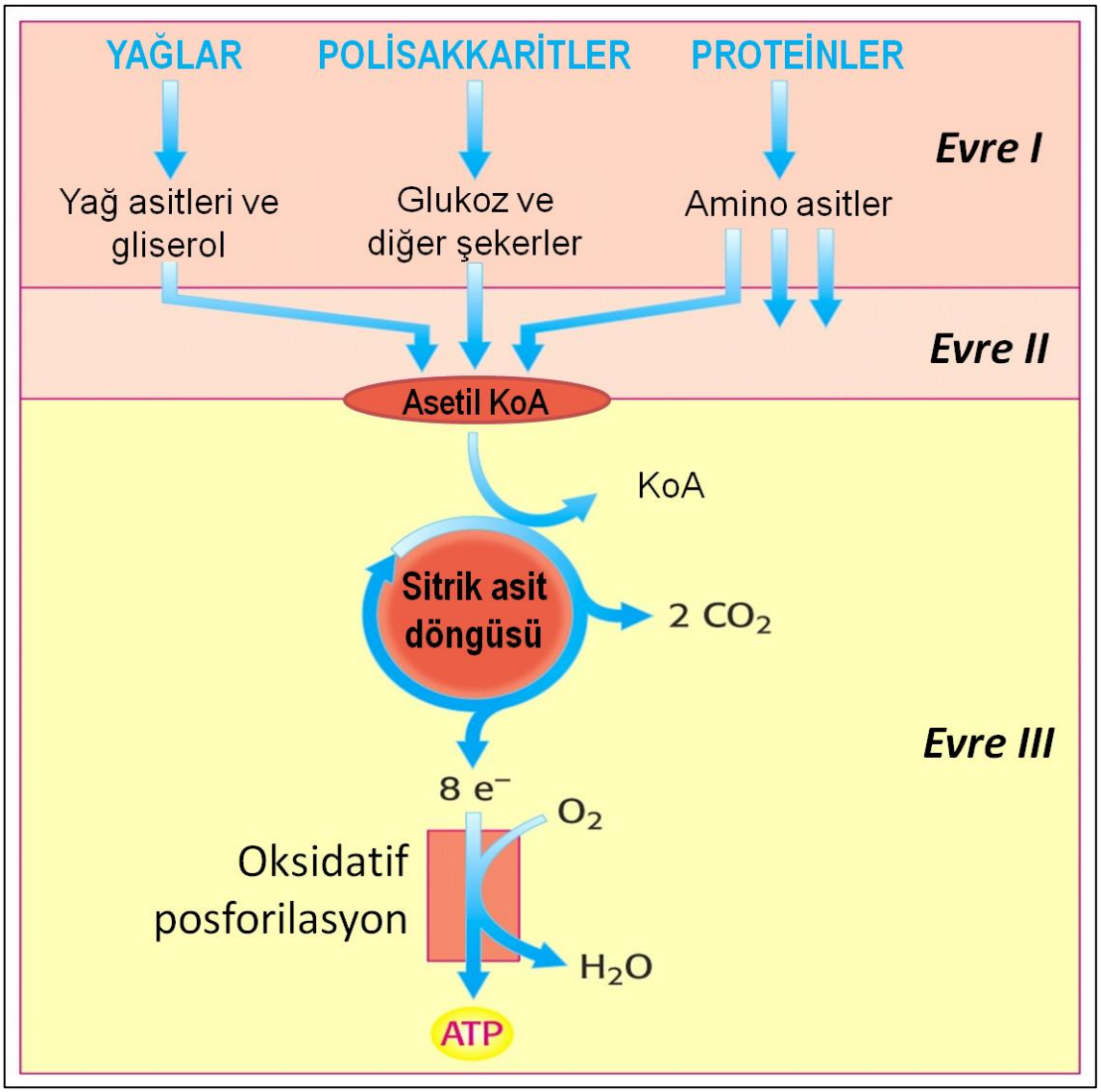
Glikoliz, enerji gerektiren bir aşamadan sonra enerji salma aşamasından oluşmaktadır. Glikoliz mekanizması ile glukozun pirüvata dönüşmesi on enzimin

katalizlediği bir reaksiyon dizisidir. Glikoliz laktik asit fermantasyonundan önde gelir ve önceki basamakta yapılan pirüvat sonraki işlemde yapılan laktat için ana koşuldur (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 : Glukozdan laktat üretimi

Laktik asit fermantasyonu düşük mitokondriyal seviyelerde ve metabolik gereksinimdeki hayvan dokularında ATP'nin ana kaynağıdır. Mitokondrisi olmayan hücreler için ATP'nin tek kaynağı laktik asit fermantasyonu olmakla birlikte bu hücrelerin ATP ihtiyacı oldukça azdır (Şekil 2.10). (Chen 1993)

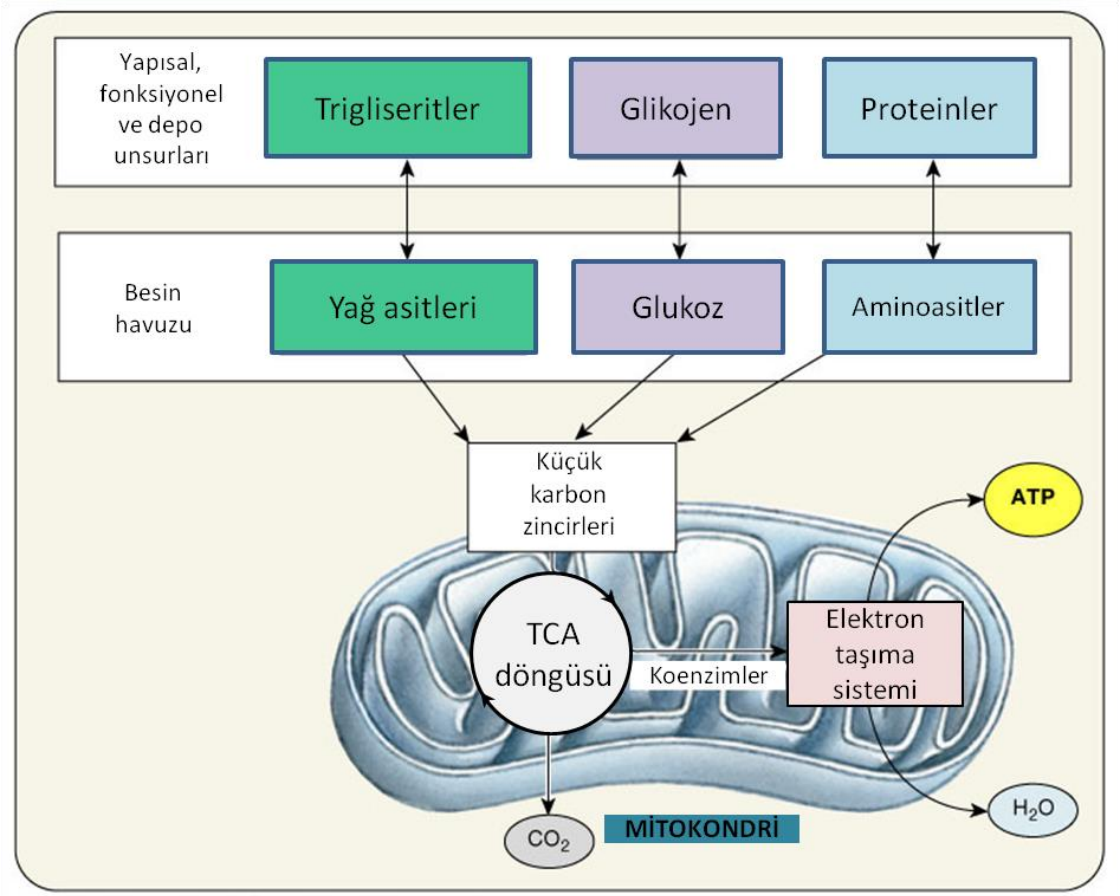


Şekil 2.10 : Metabolik gereksinimler için hayvan dokularında enerji kaynağı.

Enerji üretim mekanizmasında mitokondrisi ve yeterli oksijeni olmayan hücrelerde glukozun laktata dönüşümü anaerobik glikoliz olarak isimlendirilmektedir. Aerobik glikoliz için gereken enzim sistemleri mitokondride yerleşmiştir. Beyin, eritrositler ve iskelet kası vücutta laktik asit üretiminin büyük bir kısmının gerçekleştiği noktalardır. Metabolik reaksiyon sonucu pirüvattan meydana gelen laktat karaciğerde yeniden glukoza dönüştürülmektedir ve tekrar enerji üretim döngüsüne katılmaktadır. Bu döngüye kori siklusu adı verilmektedir (Şekil 2.8). Laktat anaerobik metabolizmanın çıkmaz atık ürünü olarak isimlendirilmektedir. Dengeli bir şekilde laktat dehidrogenaz enzimi tarafından katalizlenen pirüvatın laktata indirgenmesi devam eden glikolitik

mekanizma için gerekli olan NAD'nin yenilenmesinde rol oynamaktadır. (DiGirolamo 1992, Passarella 2003)

Mitokondride hücre için gerekli enerji üretimi mekanizmalarının dengeli ve uyumlu çalışması sonucunda metabolik gereksinimler için ihtiyaç duyulan enerji sağlanmış olur (Şekil 2.11).

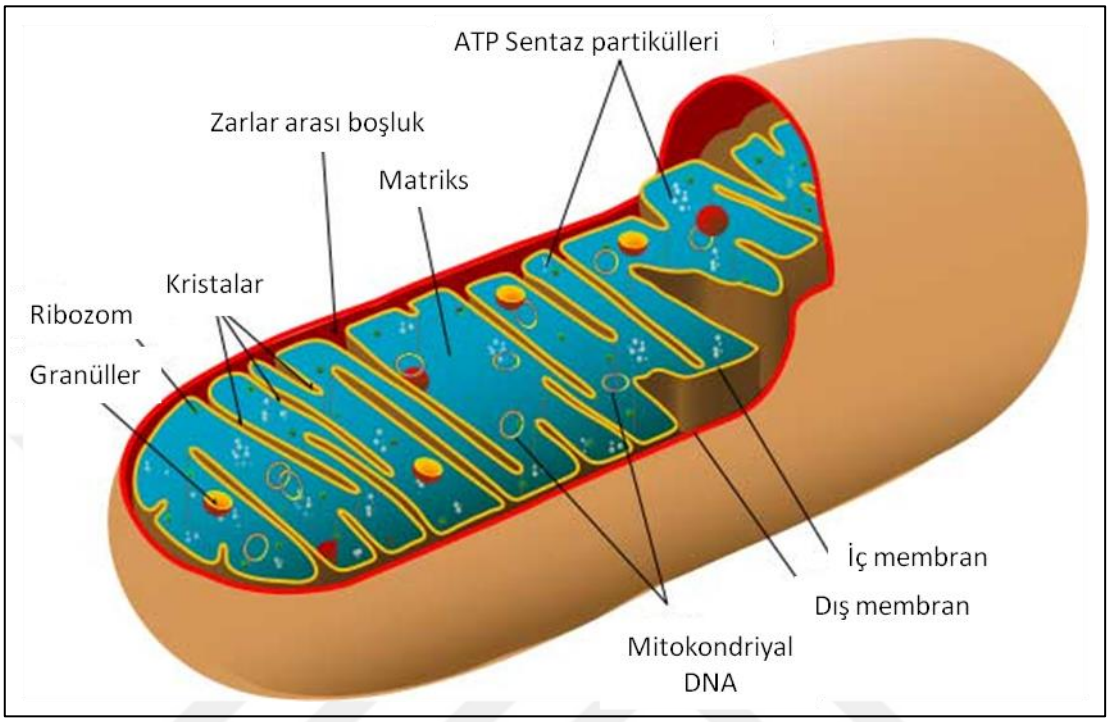


Şekil 2.11 : Mitokondride enerji üretim süreçleri

2.6. MİTOKONDRİ

Mitokondri, her hücrenin sitoplazmasında bulunan , oksijenden enerji üreten ve besin üreten hücre organelidir. Her hücrenin enerji ihtiyacı doğrultusunda içinde bulunan mitokondri miktarı da değişiklik göstermektedir. Bir hücrede bir kaç yüz ile birkaç bin mitokondri bulunabilir. Her hücrede farklı şekil ve büyüklüklerde bulunabilirler. Mitokondriler bir kaç yüz mikron çapında küresel yapıda olabilecekleri gibi, bir mikron çapında ipliksi yapıda da olabilirler.

Mitokondrinin yapısı; dış ve iç membran olarak çift membran, membranlar arası boşluk, matriksler ve kristalardan oluşur (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 : Mitokondrinin yapısı

Dış zar, taşıma işlemleri için özelleşmiş proteinlerden meydana gelir. Boyut olarak ufak moleküller ve iyonlar serbestçe geçerler ve membranlar arasındaki boşluk bu molekül/iyon geçişlerine mani olmaz. Dış zar, fosforik asit ve fosfolipit sentezinde rol oynayan enzimlerle birlikte KREBS çemberinde rol oynayan (katalizör) mono amin oksidaz (MAO), sitokrom-c reduktaz enzimlerini barındırır.

İç zar, yüzey alanını genişletmek için kıvrımlı yapıdadır ve seçici geçirgen bir zardır. Bu zarda elektron transport zincirine (ETZ) ait enzimler ve oksidatif fosforilasyon enzimleri yer almaktadır. Bazı özel maddeler için de bu zarda taşıma sistemi bulunur İç membranı özel taşıyıcı sistemi olanlar geçebilir. Süksinat, piruvat, malat, sitrat, α-ketoglutarat, elektron transport zinciri bileşenleri (kompleks I-IV) ADP-ATP translokazlar FoF1 ATP sentaz (kompleks V) Piruvat ve yağ asitlerinin taşınmasında görevli proteinler bu şekilde iç zardan geçebilirler. İç zarda elektron transferinden sorumlu (Kompleks I-II-III-IV) ve ATP sentezinden sorumlu (Kompleks V) beş kompleks vardır.

Matriks; jel yapıda bir maddedir, bu madde içinde erimiş enzimler yer alır. Yüksek enerji kaynağı olan adenozin trifosfat (ATP) oluşumu bu erimiş enzimlerle birlikte iç zardaki oksidatif enzimler sayesinde besinlerin yakılarak karbondioksit ve suya çevrilmesi sürecinde gerçekleşir. Matrikste ayrıca trikarboksilik asit (TKA) döngüsünde ve yağ asitlerinin β-oksidasyonunda görev alan enzimler yer almaktadır.

- **Mitokondriyal DNA**: Mitokondriler hücre çekirdeğindeki deoksiribonukleik asite (DNA) benzer fakat tamamen aynı olmayan DNA içerirler. Bu mitokondriyal DNA mitokondrilerin çoğalmasında görev alır.

Mitokondrinin hücre için en önemli fonksiyonu enerji üretmektir. Mitokondri bu fonksiyon dışında genetik hastalıklar, apopitozis ve kalsiyum dengesinde de önemli fonksiyonlara sahiptir.

2.6.1. Oksidatif Fosforilasyon (OXPHOS)

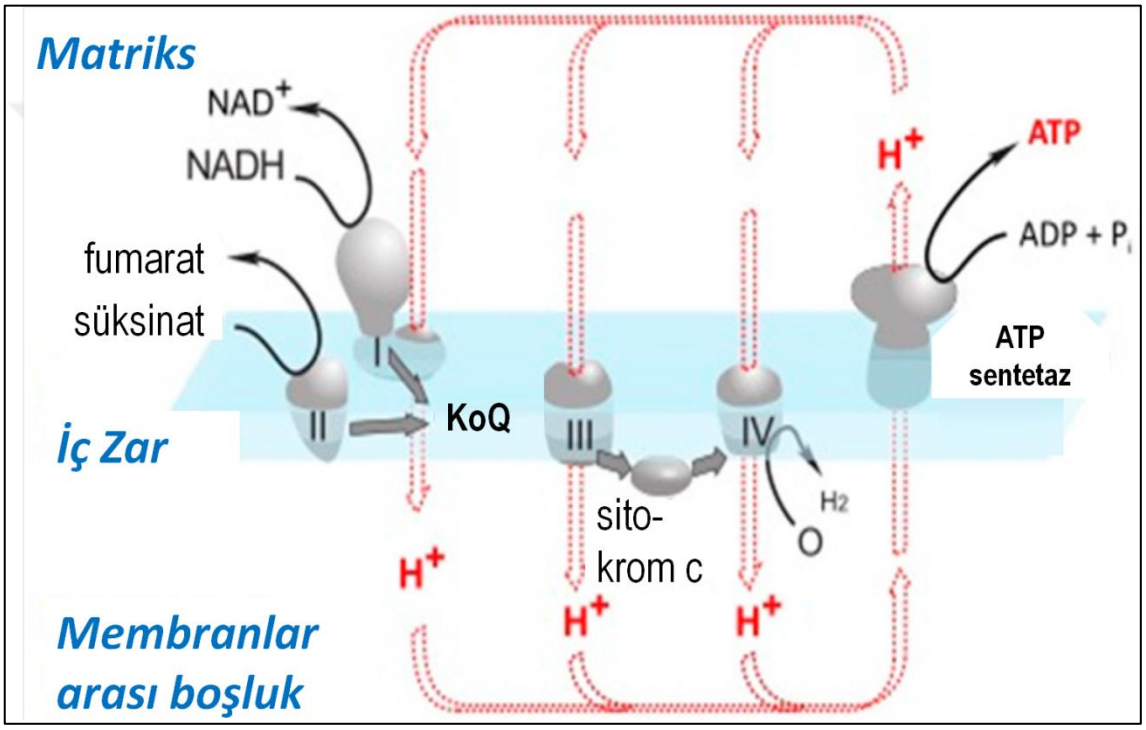
Mitokondrinin en önemli fonksiyonu elektron transport zinciri (ETZ) ve oksidatif fosforilasyonla (OXPHOS) enerji üretmektir. Aerobik hücrelerde değişik substratlardan alınan elektronların yükseltgenme ve indirgenme olayları ile oksijene taşındığı yola elektron transport zinciri adı verilir. Substratların çoğu bu yolu kullanır. Elektronların, elektron transport zincirinde taşınması sırasında oluşan enerjinin adenozin difosfat (ADP) ve inorganik fosfor (Pi) ile birleşip ATP oluşturması olayına oksidatif fosforilasyon denir.(Hunter 2019)

Mitokondriyal solunum zincirinin protein komponentlerini oluşturan dört kompleks, kendilerine özel bileşime sahip multienzim kompleksleridirler.

- Kompleks I: NADH dehidrogenaz
- Kompleks II: Süksinat dehidrogenaz
- Koenzim Q (ubikuinon): mobil elektron taşıyıcısı
- Kompleks III: sitokrom b + sitokrom c_1
- Sitokrom c: mobil elektron taşıyıcısı
- Kompleks IV (sitokrom oksidaz): sitokrom a + sitokrom a_3
- Kompleks V: ATP sentaz

Koenzim Q dışındaki hepsi protein yapılıdır. Sitokrom c dışındakiler iç membranda; sitokrom c membranlar arası boşlukta bulunur. Sitokrom c, enzim komplekslerinden birinin bir parçası değildir; kompleks III ve kompleks IV arasında hareketli bir proteindir.

Enerji taşıyan moleküllerin yükseltgenmesi sonucu açığa çıkan elektronlar, Kompleks I veya Kompleks II aracılığı ile ETZ' ye girer. Koenzim Q (ubikuinon), Kompleks I veya Kompleks II'den aldığı elektronları Kompleks III'e aktaran mobil (hareketli) elektron taşıyıcısıdır. Sitokrom c, Kompleks III' ten aldığı elektronları Kompleks IV'e aktaran mobil elektron taşıyıcısıdır. Kompleks IV, sitokrom oksidaz olarak adlandırılır ve moleküler oksijeni suya indirger. Kompleks I, III ve IV, aynı zamanda birer proton pompası olarak görev yapar ve elektronların akışı sırasında matriksten membranlar arası boşluğa proton pompalar (Şekil 2.13).



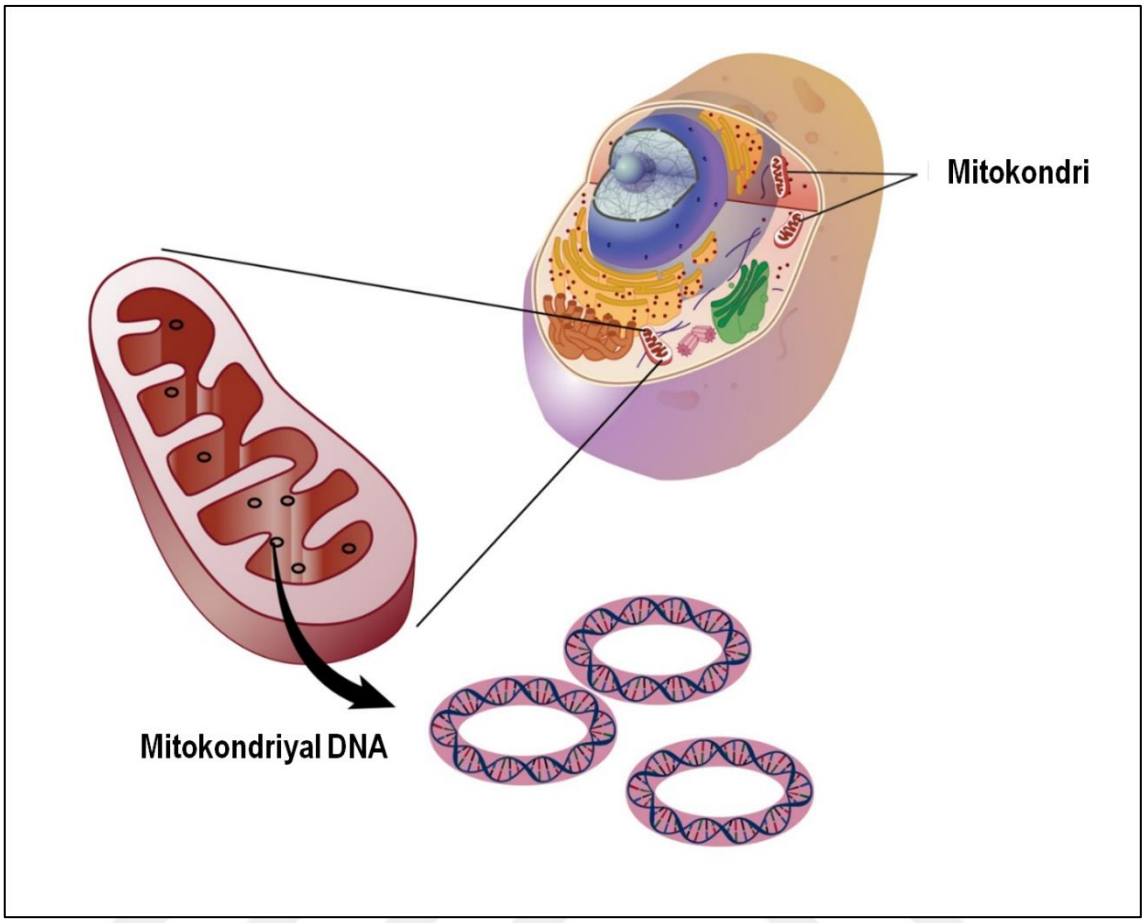
Şekil 2.13: Mitokondri iç zarında oksidatif fosforilasyon aşamalarının şematik gösterimi. Normalde kompleks I, III ve IV respirasome işlevi gören daha büyük bir süper kompleksin kısımlarıdır.

Oksidatif fosforilasyonun düzenlenme mekanizması, hücrenin enerjiye olan gereksinimi vasıtasıyladır. Mitokondride solunumun hızı yani oksijen tüketimi, genel olarak, fosforilasyon için bir substrat olan ADP'nin elde edilebilirliği tarafından kontrol edilir. Ortamda ADP bulunmadığı zaman elektron akışı devam etmez; ATP oluşumu ve oksijen harcanması düşüktür. Bir iş yapıldığında ATP, ADP' ye çevrilir; bu, daha fazla solunumun meydana gelmesini sağlar ve bu da ATP depolarını yeniden doldurur. Ortamda ADP artışı ile hücre solunumu da 5-10 kat artmış olur.

ATP olarak tutulmayan serbest enerjinin geri kalan kısmı, ısı şeklinde salıverilir. Bu, bütün olarak solunum sisteminin denge halinden yeterli ekzergonik (enerji açığa çıkartan katabolik reaksiyon) halde olmasını sağlayarak devamlı tek yönlü bir akışa ve sabit bir ATP eldesine olanak verir; sıcakkanlı hayvanlarda vücut ısısının sürdürülmesine katkıda bulunur. Mitokondri ile ilişkili hastalıkları anlamak için ETZ ve OXPHOS yolağının bilinmesi gerekmektedir.

2.6.2. Mitokondriyal DNA

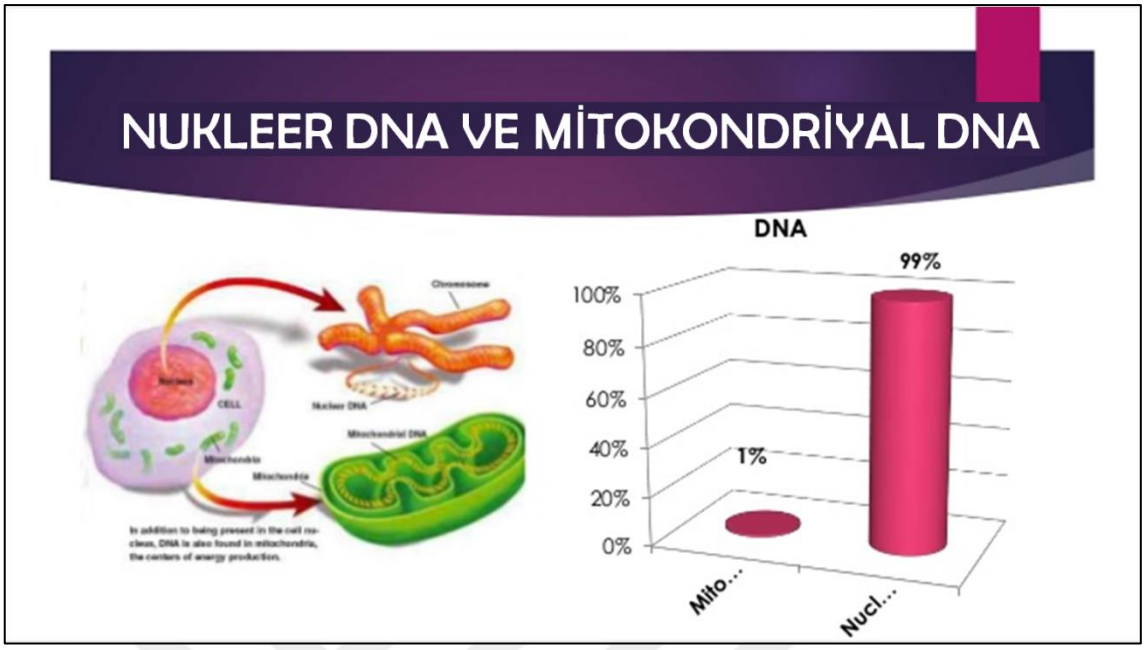
Mitokondriyal DNA (mtDNA) hücrelerimizdeki mitokondride bulunan ve genellikle hücrelerin pilleri veya güç merkezleri olarak adlandırılan enerji üreten DNA'dır. Mitokondri hücre çekirdeğinde bulunandan ayrı olarak kendi genomuna sahip bir organeldir (Şekil 2.14). Mitokondriyal DNA ilk olarak mitokondri içinde 1963 yılında tespit edilmiştir. Mitokondriyal DNA hepsi normal mitokondriyal fonksiyon için gerekli 37 gen içermektedir. Bu 37 genden 13'ü oksidatif fosforilasyonda gerekli olan enzimleri yapmak için talimat vermektedir. Bu 13 genin kodladığı oksidatif fosforilasyon mekanizmasının temelini oksijen ve basit şekerlerin kullanılarak hücrelerin temel enerji kaynağı ATP'nin elde edilmesi olarak tanımlayabiliriz. Oksidatif fosforilasyon kompleksinin artan 74 polipeptidi nükleer genomda kodlanmaktadır.



Şekil 2.14 : Mitokondriyal DNA

Mitokondriyal DNA'yı yapısal olarak incelediğimizde, mtDNA dairesel, çift sarmallı bir molekül olup, enerji üretimi için gerekli 13 alt birimi, 2 ribozomal RNA'yı ve 22 transfer RNA'yı kodlayan 16,569 baz çiftinden meydana gelmiştir. Mitokondri aynı zamanda çift membranlı bir organel olup, enerji transfer yolunda membranlarda yerleşik enzim sistemleri aktif rol oynamaktadır. mtDNA'nın ekspresyon ve sürekliliği sitozolik ribozomlarda sentezlenen öncül polipeptidler olarak adlandırılan nükleer kodlanmış faktörlere bağlıdır ki bunlar özelleşmiş geçiş porları aracılığıyla mitokondri içersine geçerler. Mitokondriyal DNA'nın en önemli özelliklerinden birinin sadece maternal geçiş göstermesi olduğunu söyleyebiliriz.

Mitokondriyal DNA hücrenin genetik yapısının yaklaşık olarak %0.25'ini oluştururken, nükleer DNA hücrenin genetik yapısının %99.75'ini oluşturmaktadır (Şekil 2.15). Mitokondriyal DNA esas olarak solunum zinciri üzerinde etkili olup, beş mitokondriyal solunum kompleksinden dördünün bileşenleri mtDNA tarafından kodlanmaktadır.



Şekil 2.15 : Nükleer ve mitokondriyal DNA

İnsan hücreleri her biri birkaç mitokondriyal DNA kopyası içeren en az 1000 mitokondri içermesi ile diğer hücrelerden farklılaşmaktadır. Oksidatif fosforilasyon mitokondriyal DNA tarafından kodlanan polipeptidlere bağlı olmasına rağmen, aynı zamanda çok sayıda nükleer DNA ürününü de gerektirmektedir.

Mitokondriyal DNA'nın kalıtsal delesyonları mitokondriyal hastalıklar olarak isimlendirilen verimsiz oksidatif fosforilasyona neden olmaktadır. Memeli mtDNA'larının nükleotid dizilerinin karşılaştırılması, diğer üç bölgede olduğu gibi promotor bölgedeki koruma derecesini açığa çıkarmıştır ki bunlar koruma dizi blokları yada CSBI, CSBII, CSBIII olarak isimlendirilmektedir. Bu diziler birçok omurgalının D-loop bölgesinde korunmaktadır. CSB'lerin mtDNA replikasyonunun bazı yönlerini kapsadığı varsayılmaktadır. Çünkü onlar D-loop bölgesinde yerleşmiştir ve CSBI'in H-iplik DNA sentezi için başlangıç bölgesinin yakınında olduğunu söyleyebiliriz. Bununla birlikte, bazı omurgalılarda CSB'lerin yokluğu bu elementlerin fonksiyonlarının belirli D-loop bölge yerleşim şekilleriyle önlenebileceğini yada diğer yeni nükleotid dizilerinin (yada protein faktörlerinin) bu organizmalarda aynı fonksiyonu sağlayabildiğini göstermektedir. D-loop bölgesinin büyük çoğunluğu çok değişken bölgeler ve kodlanmayan diziler içermektedir. Her ne kadar bu aşırı değişken bölgelerde genel

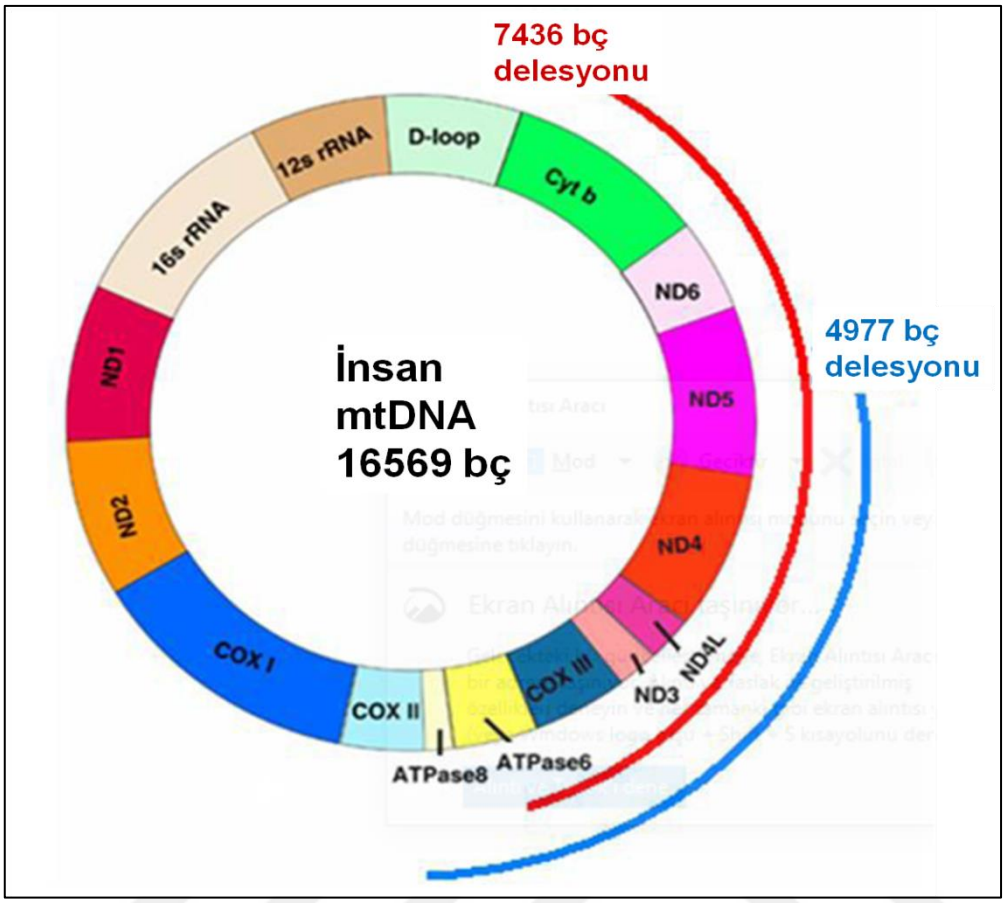
mutasyon oranı mtDNA'nın geri kalanından önemli ölçüde yüksek oranda olsa da bazı nükleotid pozisyonları değişiklikler için sıcak noktalar olarak gözükmektedir.

2.6.3. Mitokondriyal DNA Delesyonları

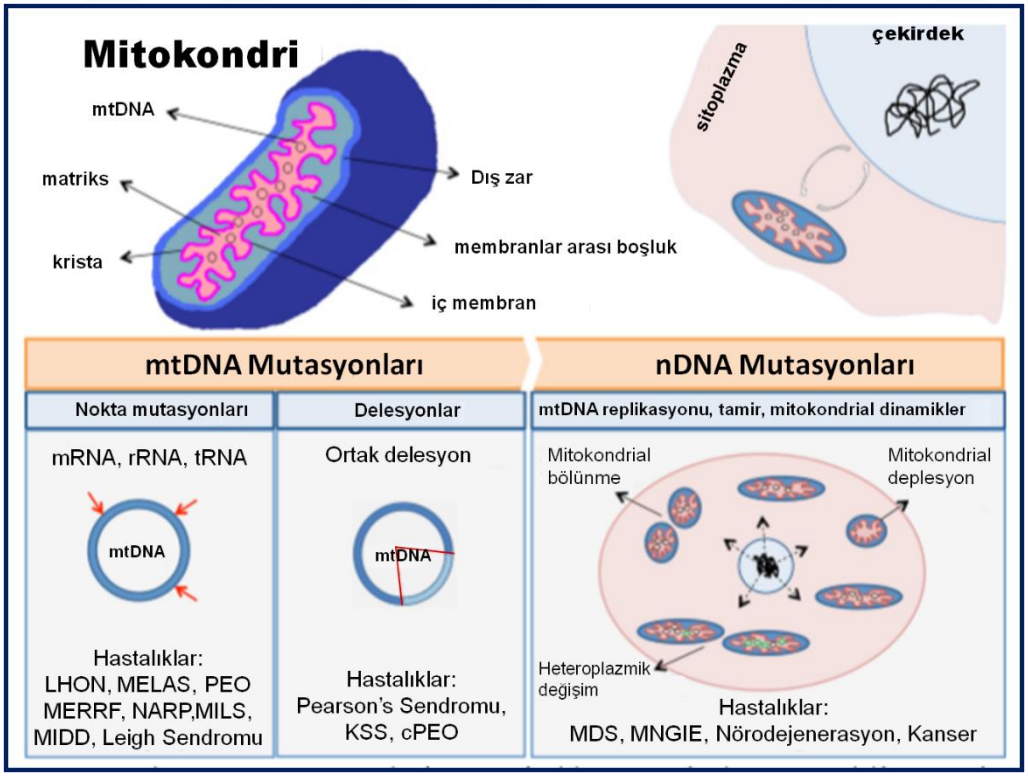
Mitokondriyal DNA'da 13 protein kodlayan gen çeşitli solunum zinciri bileşenleri arasında dağılmıştır. Bu dar aralıklı genler arasında kodlanmayan DNA'nın büyük bir kısmını içeren D-loop bölgesi ile sadece az miktarda kodlanmayan DNA bulunur. İnsan mitokondriyal DNA'sının D-loop bölgesindeki 260 baz çiftlik ardışık kopyalanmalar ilk olarak Brockington ve arkadaşları tarafından gösterilmiş ve mitokondriyal miyopatide mtDNA delesyonları ile ilişkilendirilmiştir. 260 baz çiftlik çoğalma D-loop bölgesi denen mitokondriyal DNA'nın transkripsiyon ve replikasyonunu kontrol eden bölgede yerleşmiş ve düşük seviyede bulunan bir heteroplazmik uzunluk polimorfizmidir. Nükleer kodlanmış genlerin aksine, mitokondriyal kodlanmış gen ekspresyonu büyük ölçüde mtDNA kopya sayısı ile düzenlenmektedir. MtDNA kopya sayısındaki bir düşüş, mtRNA ve proteinlerinde buna bağlı olarak bir düşüşüne yol açar ve sonuçta mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açar. (Çağın 2015, Pitceathly 2012)

Mitokondriyal DNA delesyonları mtDNA çoğalma, bakım ve tamir mekanizmalarındaki kusurlardan kaynaklanmaktadır. Mitokondriyal DNA delesyonları çoğunlukla replikasyon (çoğalma) başlangıçları arasında (OH-OL) ve ardışık tekrar dizileriyle çevrili bölgeler arasında meydana gelmektedir. Büyük ölçekli mtDNA delesyonlarının büyüklüğü değişebilir ancak birçok hastada ATPase8 ve ND5 genlerini kapsayan 5kb'lık yaygın delesyonlar önemli ölçüde izlenmektedir (Şekil 2.16). (Kim 1997, Tuppen 2010, Yusoff 2019)

En yaygın olarak gözlemlenen mtDNA delesyonları şunlardır; Pearson sendromu, Kearns-Sayre sendromu (KSS) ve kronik ilerleyici dış oftalmoplaji (C PEO) (Şekil 2.17). Bazı çalışmalar özellikle mtDNA delesyonlarının yaşla sinir sistemi hastalıklarıyla bağlantılı olarak arttığını göstermiştir. (Wallace 1990)



Şekil 2.16 : Mitokondriyal DNA delesyonları (Kayaaltı 2009'dan modifiye edilmiştir)



Şekil 2.17: Mitokondriyal DNA mutasyon ve delesyonlarına bağlı görülen hastalıklar (Çağın 2015'den modifiye edilmiştir.)

2.6.4. Mitokondriyal DNA Delesyonları Ve Oksidatif Fosforilasyon Mekanizmasına Etkisi

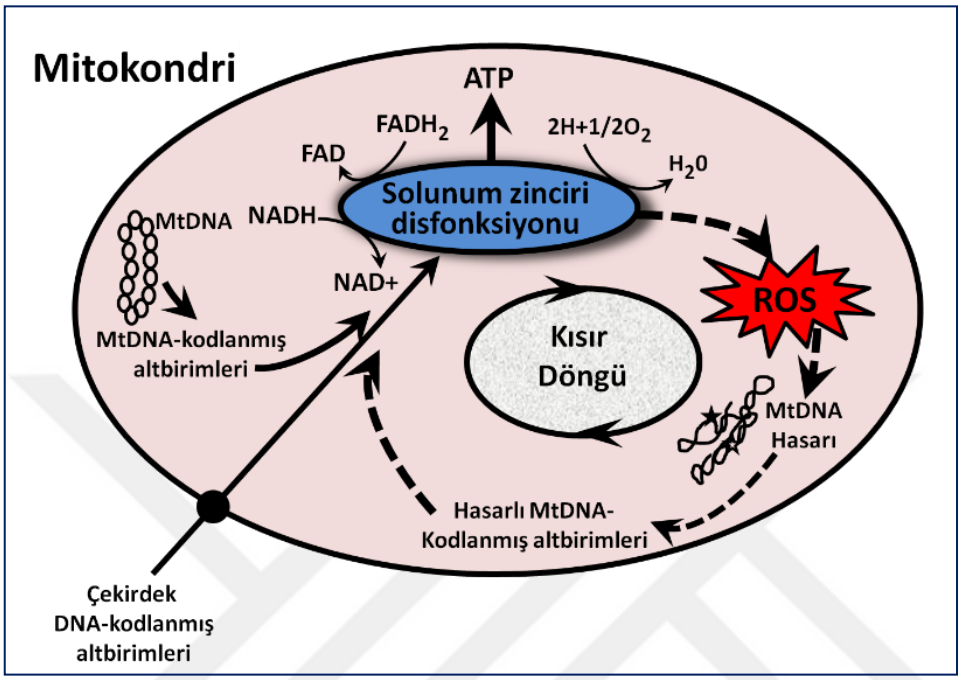
Mitokondriyal DNA oksidatif fosforilasyon mekanizmasını yöneten bir gen alt kümesini kodlayarak mekanizmayı yönetmektedir. Mitokondriyal DNA'da meydana gelen herhangi bir delesyon bu genlerin bir kısmının yok olmasına neden olmakta ve sonuçta mitokondriyal hastalıklara neden olan mitokondriyal fonksiyon bozuklukları meydana gelmektedir. (Richter 1995)

Hücresel solunum (OXPHOS) bir dizi enzimin katalizlediği bir reaksiyon dizisinden oluşmakta olup, mitokondri içinde enzimatik reaksiyon ile elektronların moleküler oksijene aktarılması ve enerji kaynağı ATP oluşumu temel basamaktır. Bu reaksiyonda meydana gelen mtDNA delesyonlarına bağlı bir aksaklık laktik asidoz oluşumuna neden olmaktadır. Burada NADH/NAD oranı artmış ve laktat dehidrogenaz dengesi laktat yönüne kaymıştır. Laktat/pirüvat oranında belirgin artış olup, bu oksidatif fosforilasyon defektlerinin laktik asidoza neden olan diğer etkilerden belirgin şekilde ayrılmasını sağlamaktadır. (Karimova 2015)

Mitokondri iç zarında bulunan beş enzim (Kompleks I, II, III, IV, V) OXPHOS reaksiyonu için gerekli temel moleküllerdir. Yağ asitlerinin Krebs siklusu ve β-oksidasyon, karbonhidratların oksidasyonu ile NADH ve FADH2 indirgenmekte ve elektronlar sağlanmaktadır. Elektronlar bir taşıyıcı dizisi arasından geçtikten sonra oksijenin suya indirgenmesi olan son aşamaya kadar elektronegatif alıcılar arttırılmaktadır. Mitokondri zarlar arası boşluğuna mitokondri matriksi içinden aktif olarak protonlar pompalanarak ki bunu sağlayan enzimler Kompleks I, III, IV' dür, bunun sonucunda da her basamakta enerji salınımı meydana gelmektedir. ADP ve inorganik fosfattan ATP oluşumunun gerçekleşmesi için Kompleks V (ATP sentaz) etkili olmakta ve proton gradiyenti sayesinde fonksiyon göstermektedir. (Lim 2002)

Mitokondriyal DNA aerobik solunum için gerekli olan OXPHOS alt birimlerinin sentezini sağlayan 37 geni kodlayarak etkili olmaktadır. Histon proteinlerinin eksikliği ve sınırlı Mitokondriyal DNA tamir sisteminin olması dolayısıyla iç mitokondriyal membranda reaktif oksijen bileşenlerinin yol açtığı oksidatif DNA hasarına en duyarlı olan yapı mtDNA olarak gözükmektedir. Solunum sürecinde mtDNA OXPHOS alt

birimlerinde 13 ila 90 alt birimi kodlayarak enerji üretim sürecinde ciddi katkı sağlamakta mtDNA'da meydana gelen delesyona bağlı fonksiyon bozukluğu tüm solunum süreci basamaklarını sekteye uğratmaktadır (Şekil 2.18). (Zeviani 1997)

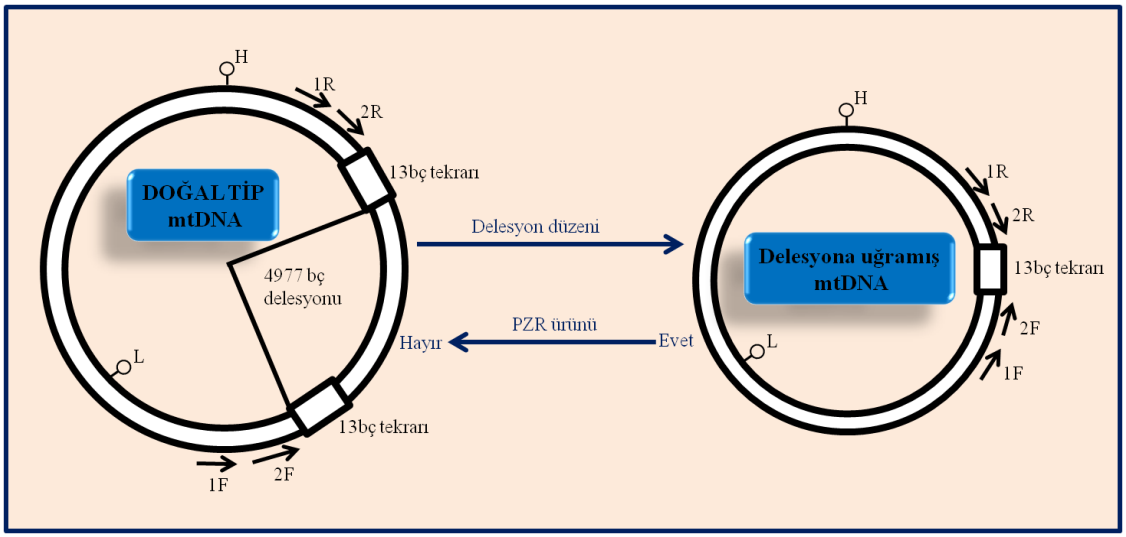


Şekil 2.18 : Solunum sürecinde delesyona bağlı fonksiyon bozukluğu. (Ide 2001'den modifiye edilmiştir)

2.7. Mt DNA 4977 DELESYONU

130'dan fazla farklı mitokondriyal DNA delesyonu tanımlanmış olup, bu delesyonların çeşitli mitokondriyal hastalıklara neden olduğu saptanmıştır. Mitokondri hastalık grupları arasında kronik ilerleyici oftalmoplaji, Kearns-Sayre sendromu, Pearson's sendromu sayılabilir. (Chen 2011, Sano 1993)

Mitokondriyal DNA 4977 delesyonu yaşla ve çeşitli hastalıklar ile bağlantılı olduğu saptanmış, 8.469 ve 13.447 nükleotidleri arasında yerleşmiş bir delesyondur (Şekil 2.19). Bu bölge ATPaz 6, ATPaz 8, sitokrom oksidaz III, NADH dehidrogenaz alt ünite 3 (ND3), ND4, ND4 alt ünite L (ND4L) ve ND5'i bulundurduğundan özellikle oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) açısından büyük önem taşımaktadır. Özellikle mtDNA 4977 delesyonunun fazla olduğu bazı, hastalarda yaşla bağlantılı olarak iskemik miyokart gibi çeşitli dokularda iskemik bölgelerin fazla olduğu belirtilmektedir. (Lee 1994, Shenkar 1996)

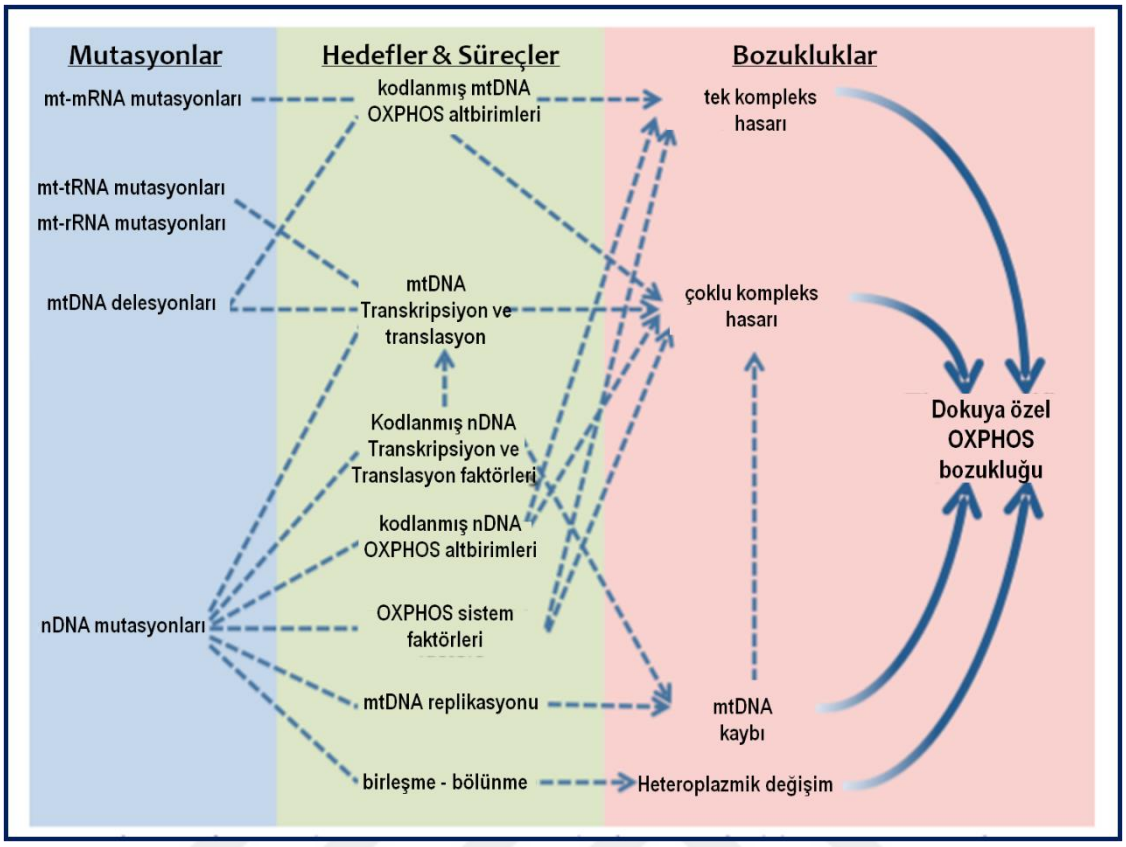


Şekil 2.19: MtDNA 4977 delesyonu. (Chen 2011'den modifiye edilmiştir)

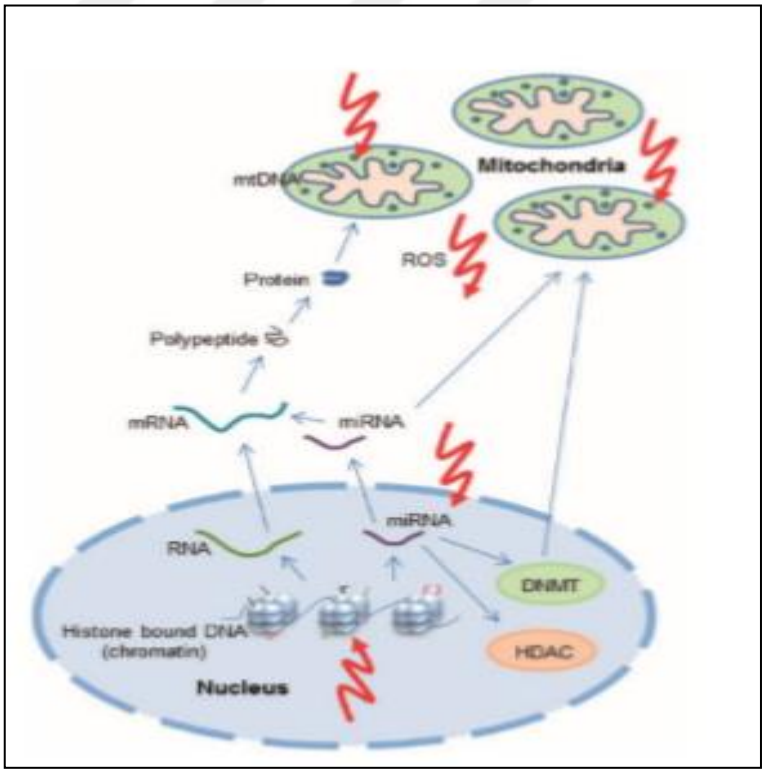
Mitokondriyal DNA 4977 delesyonu 22 tRNA geninden 5'ini ortadan kaldırırken (tRNAGly, tRNAArg, tRNAHis, tRNASer, tRNALeu) aynı zamanda mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun normal yürümesini sağlayan 4 Kompleks1 alt birimleri (ND3, ND4, ND4L, ND5), 1 Kompleks 4 alt birimi (COX III), 2 Kompleks 5 alt birimi (ATPaz6 ve ATPaz8) kodlayan genleri de ortadan kaldırır. Bu OXPHOS'un bozulmasını sağlayan önemli bir etkidir (Şekil 2.20).

Mitokondriyal DNA 4977 delesyonu sınıflandırıldığında, iki 13 bp'lik direkt tekrarların olduğu bölgeyi içeren delesyonlar; 5' ve 3' uç kesme sınırlarını çevreleyen (ACCTCCCTCACCA), 8470-8482 nükleotid pozisyonunda bulunan (ATPaz 8 geni içinde) ve 13447-13459 (ND5 geni içinde) bulunan delesyonlar bu sınıflar olarak sayılabilir. Genel olarak 8470 ila 13446 pozisyonunda delesyona uğrayan nükleotid dizileri bulunurken, tekrarlardan biri delesyonlu parça ile kaldırılırken, diğerlerinin mtDNA4977'de saklandığı bilinmektedir. (Zhang 2015)

Mitokondriyal DNA 4977 delesyonu sonucunda delesyonlu bölge içinde bulunan kodlanmış bölgelerin ve tRNA genlerinin kaybı ile mitokondriyal protein sentezi ile birlikte mitokondriyal biyogenez süreci de etkilenmektedir. Mitokondriyal DNA 4977 delesyonunun temel etkisi, ATP üretiminin tamamen durması ve mitokondriyal fonksiyonların bozulmasıdır (Şekil 2.21). (Zheng 2012)



Şekil 2.20: MtDNA delesyonlarının oksidatif fosforilasyona etkisi (Çağın 2015'den modifiye edilmiştir)



Şekil 2.21: MtDNA delesyonunun etkileri

3. TEZ MATERYAL VE METOD

3.1. YÖNTEMLER:

3.1.1. Seçilen Örneklerin Tanımı:

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma materyalleri 2016-2019 Ekim-Mart ayları içerisinde toplanmış ve aşağıda belirtilen şekilde çalışılmıştır.

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim dalında obezite tanısı konmuş morbid ameliyatı olan hastalardan alınan yağ dokusu ve vücut kitle indeksi 35'in altında olan farklı rahatsızlıklarından dolayı ameliyat edilen kontrol grubundan alınan yağ dokusu materyalleri ile çalışılmıştır.

3.1.2. Çalışma Grubu;

- Vücut kitle indeksi 35'in üstünde olan diyabetik ve non-diyabetik obezite tanısı konmuş hasta
- Kontrol Grubu

3.1.3. Dokuların Toplanması ve Saklanma Koşulları:

Çalışmada morbid ameliyatı yapılan obezite tanısı konmuş hasta grubu ve kontrol grubunun doku örnekleri (20-100 mg) önceden sterilize edilmiş ependorf tüplerin içerisine alınarak Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında -80 °C'de saklanmıştır.

3.1.4. Yağ Dokusundan DNA İzolasyonu:

DNA izolasyonu, kit kullanılmak suretiyle ve üretici firmanın (Roche) tavsiye ettiği yönteme uygun şekilde yapıldı.

3.1.5. DNA İzolasyon Yöntemi

1. Buffer Hazırlanması:

- Proteinaz-K solüsyonu hazırlamak için Proteinaz K Buffer kullanıldı.
- Liyofilize olmuş RNAz A'da yeterli miktarda RNaz Buffer ile sulandırıldı.
- GB, GW1 ve GW2 Bufferlarına etanol eklendi.

- Bufferlar 50-60 °C'de tortu çözülene kadar karıştırıldı. Oda ısısında soğumaya bırakıldı.

2. Doku örnekleri (2-10 mg) uygun petri kaplarında bisturi aracılığıyla küçük parçalara parçalandı.
3. Parçalanan yağ dokusu örnekleri 1,5 ml'lik ependorf tüplere alındı.
4. Doku örneğinin üstüne 375 µL GL Buffer eklenip 20s vortekslendi.
5. 25µL Proteinaz K eklendi ve birkaç kere tüp ters yüz edilerek yada vortekslenerek karıştırıldı.
6. Tamamen parçalanana kadar 55°C'de inkübe edildi. Her 30-60dk'da 20s kuvvetlice vortekslenip karıştırıldı.
7. 4µL RNaz A eklendi ve 37°C'de 5dk inkübe edildi.
8. 400 µL GB Buffer eklenip 10s iyice karıştırıldı.
9. 13 000 x g'de 2 dk santrifüj edildi.
10. Toplama tüpüne yerleştirilmiş minikolona süpernatan kısmı aktarıldı. Hiçbir doku kalıntısının onun ile taşınmamasına dikkat edildi.
11. 13 000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

- Santrifüjden sonra arıtma kolonunun içi kuru olmalıdır. Sütunun üst kısmında eğer herhangi bir sıvı varsa, 2 dk max hızda yeniden santrifüj edilmelidir.

12. Arıtma kolonu 2ml'lik yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
13. 600 µL GW1 Buffer eklenip 13 000 x g'de 30s santrifüj edildi.

- Filtrat boşaltılır, toplama tüpü tekrar kullanılır.

14. 500 µL GW2 Buffer eklenip 13 000 x g'de 30s santrifüj edildi.
15. Filtrat boşaltıldı ve toplama tüpü tekrar kullanıldı.
16. 13 000 xg'de 1-2 dk santrifüj edildi.

- Yıkama buffer'ı alkol içerir, bazı enzimatik reaksiyonlara neden olabilir ve elüsyon yeteneğini azaltabilir. Bu nedenle elüsyondan önce minikolonun alkol içeriğini tamamen uzaklaştırmak önemlidir.

17. Toplama tüpü ayrıldı ve arındırılmış minikolon steril 1,5ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
18. 50-200 µL Elüsyon Buffer eklendi.

- Elüsyon Buffer 70°C'de önceden ısıtılmış olmalıdır.

19. Minikolon oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi.
20. 13 000 x g'de 1 dk santrifüj edildi.

21. Minikolon kaldırılıp izole edilmiş DNA kısa vadede kullanım için +4°C'de uzun vadeli kullanımda -20°C'de saklandı.

DNA Konsantrasyonunun ve Saflığının Ölçülmesi

Örneklerinin miktar ve kalite ölçümleri Nano Drop cihazı kullanılarak yapıldı.

İzole edilen DNA konsantrasyonu ve saflık ölçümleri 1'er µl DNA örneğinin NanoDrop Scientific TM 1000 (Thermo Fisher, Delaware, USA) cihazına yüklenerek belirlendi.

3.1.6. MtDNA 4977 Delesyon Analizi

PZR ile mt DNA 4977 bp ve mt DNA'nın Miktar Analizi

Yağ dokusundan izole edilen DNA örneklerinde mt DNA 4977 delesyonu ve mitokondriyal referans fragmanın seviyeleri flüoresans bazlı kantitatif PZR ile belirlenmiştir. Mt DNA'nın delesyonsuz (korunan) bölgeleri total mt DNA için referans alınmıştır.

Aşağıdaki Primer Setleri Kullanılmıştır:

Normal mt DNA (mt DNA^{n}; internal kontrol)
F 5'- AACATACCCATGGCCAAC-3'
R 5'-TCAGCGAAGGGTTGTAGTAGC-3'
(249 bp)

Mt DNA 4977 Delesyonu
F 5'- TATGGCCCACCATAATTACCC-3'
R 5'- AAGCGAGGTTGACCTGTTAGG-3'
(270 bp)

B globin

F 5’-CAACTTCATCCACGTTCACC-3’

R 5’-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3’

(268 bp)

Saflaştırılmış PZR ürünleri üreticinin protokolüne göre (Tablo 3.1) pGEMtm T Easy vektörüne (Promega Corporation Madison, WI, USA) klonlandı ve kantitatif PZR optimizasyonu ve hassaslık analizi için her PZR çalışmasında doza bağlı plazmid yapılı (mt DNA ^{n} ve mt DNA^{4977}) standartlar kullanıldı. Plazmidler ABI Prism 3130XL Genetik Analiz Cihazı ve BigDye Terminatör V3.1 Hazır Reaksiyon Kiti kullanılarak Sanger dizileme metoduyla doğrulandı.

Tablo 3.1: PZR Protokolü

	Sıcaklık	**Zaman**
Ön Denatürasyon	95°C	2 dk
Denatürasyon	95°C	5 sn
Primer Bağlanması	60°C	10 sn (40 Döngü)
Zincir Uzaması	72 °C	5-20 sn

PZR İçin;

Tüm örneklere ait 3 primer çifti ile mtDNA 4977 ekspresyon seviyelerinin hesaplanması amacıyla β globin housekeeping primeri seçilerek reaksiyonlar gerçekleştirildi. Miks solüsyonlarının içerikleri,

PZR Reaksiyon Miksi

İçerik	**Miktar**
EvaGreen 2X qPCR Mastermix	10 µl
Primerler (10 µM)	0,5 µl
DNA	2 µl
Nuclease-free dH2O	7 µl

Çalışmamızda daha önce tez çalışması için hazırlanan ve -80°C'de saklanan plazmid vektörleri kullanıldı. Örneklerdeki delesyon ve mtDNA içeriğini belirlemek için; ortalama kantitatif döngü (Cq) değerleri hesaplandı. Her ölçüm için üç kez tekrarlandı ve bilinen bir konsantrasyonda eşleşen plazmid klonlarının bir seri dilüsyonuna karşı normalleştirildi. Örneklerdeki her hedef genin miktarı eşleşen standart eğriye göre hesaplandı. MtDNA4977 delesyonunun düzeyi, delesyona uğrayan mtDNA kopya sayısının, toplam mtDNA kopya sayısına göre yüzde oranı olarak ifade edildi. (Chuanzhong 2002) PZR sonuçları Bio-Rad Software programı ile analiz edildi.

3.1.7. Doku Laktat Üretiminin Ölçülmesi

Materyal Hazırlama:

0,1 gr doku örnekleri Buffer'da homojenize edildi.

Buffer: Potasyum Fosfat 5mmol/L
EDTA 1mmol/L
DTT 1 mmol/L
0,05 %Triton X-100 (PH 7,4)

Homojenat 15 dk, +4°C'de 10.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra orta tabaka ayrı bir ependorfa alındı. Örnekler sonikatörde 15 sn boyunca homojenize edildi. Bu homojenize örnekler; protein ölçümü, ATP ve Laktat ölçümü için kullanıldı.

Laktat Miktar Tayini

Laktik asit miktarlarının tayininde L-Laktik Asit Assay Kit (ATT Bioquest) kullanılmıştır. Kit uygulama aşamaları aşağıda belirtilmiştir:

1. NAD stok solüsyonu hazırlama:
   100x NAD stok solüsyonu hazırlama için;
   NAD şişesi içerisine 100 µL H_2O eklendi.

2. Laktat stok solüsyonu hazırlama:

100 Mm D-Laktat standart solüsyonu hazırlamak için;
L-Laktat Standart (Komponent D) içerisine 1X PBS yada 200 µL H_2O eklendi.

3. L-Laktat Standardının Sıralı Seyreltilerinin Hazırlanması:
   3.1- 1 Mm L-Laktat standart solüsyonu oluşturmak için;
   990µL PBS Buffer içine (Basamak 2'den) 10 µL L-Laktat stok solüsyonu eklendi.

   3.2- L-Laktat standardının sıralı solüsyonlarından 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0 µM almak için 1:3 sıralı seyreltilerini uygulayarak 1mM L-Laktat standart solüsyonunun 200 µL'si alındı.
   3.3- Tablo 1 ve 2'de tanımlanmış 96 kuyulu mikroplate alt kısmına L-Laktat ve L-Laktat standardı içeren test örneklerinin seyreltilmiş sırası eklendi.

4. L-Laktat Assay Karışımının Hazırlanması:
   4.1- Enzim Prob'un (Komponet A) şişesi içine Assay Buffer'dan (Komponent B) 50µL eklendi.
   4.2- Basamak 4.1'den Komponent A'nın şişesi içine NAD stok solüsyonundan (100x step1 'den) 50 µL eklendi.
   4.3- Bu 96 kuyulu plak için L-Laktat Assay karışımı yeterlidir, Kullanılmayan L-Laktat Assay karışımı tek bir ependorfa bölünerek -20 °C'de saklanabilir.

5. L-Laktat Assay İşlenmesi:
   5.1- Kuyu başına toplam 100 µL'lik L-Laktat assay hacmi yapmak için; L-Laktat standardı, boş kontrol ve test örneklerinden her bir kuyucuğa L-Laktat assay karışımından 50 µL eklendi.
   5.2- Işıktan koruyarak 2 saat 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
   5.3- Plate'in 575 ve 605 nm'de absorbans değerleri okunup 575/605 oranı belirlendi.

3.1.8. Data Analizi

Sadece dilüsyon bufferlı kontrol kuyucuklarında absorbans bir kontrol olarak kullanıldı ve L-Laktat reaksiyonlu bütün kuyucukların değerlerinden çıkarım yapıldı. L-Laktat standart eğrisi çizildi.

3.1.9. Doku ATP Miktarının Ölçülmesi

Doku ATP seviyelerinin tespiti için ATP Bioluminescence Assay Kit (Roche) kullanıldı.

Çok düşük ATP konsantrasyonlarının ölçülmesi için, ışık yayan lüsiferazın katalizlediği lüsiferin oksidasyonunun ATP bağlılığından faydalanıldı. Kit birkaç dakika boyunca devam eden sabit bir ışık sinyali yayar. Kit özellikle kinetik çalışmalar ve eşleşmiş enzimatik reaksiyonlarda ATP tespitleri için uygun olup, ATP kalibrasyon eğrisinin hazırlanması sağlanan stabilize ATP standart stoğu kullanılarak kolaylaştırılırdı. Standardın tam ATP içeriği, HPLC ve spektroskopi ile her lot için ayrı ayrı belirlendi.

Kit İçeriği; 8x10 Lüsiferaz Reaktif, Liyofilize
4x10 ATP standardı 10mg, Liyofilize

Çalışılan Solüsyonlar ve Stabilitenin Hazırlanması

Lüsiferaz Reaktifi: Lüsiferaz içeren şişenin tüm içeriğine 10 ml su ekleyerek dikkatlice çözüldü. Karıştırma ya da sallama olmadan 5 dk +2 ila +8°C'de inkübe edildi. Şişe dikkatlice döndürülerek homojen bir karışım için karıştırılırdı. (Reaktif +2 ila +8°C'de bir hafta, +15 ila +25 °C'de bir gün stabil olarak kalacaktır)

ATP Standardı: ATP içeren şişe uygun hacimde su eklenerek çözüldü. Su konsantrasyonu 10 mg/ml ya da 16,6 mM'dır. ATP standart solüsyonu +2 ila +8 °C'de bir hafta saklanabilir. ATP standart eğrisi suyla ATP standardının seri halinde seyreltilmesiyle hazırlandı.

ATP'nin Belirlenmesi:

1. Hücreler mL'de 10^5 ila 10^8'lik konsantrasyonda sulandırıldı. Eğer örnekler çok sulu ise 8000x g 'de 10 dk santrifüj edilir, süpernatan dikkatli bir şekilde ayrıldı. Dilüsyon Buffer'ın minimum hacminde (50-100 µL) pellet tekrar süspanse edildi.

2. ATP standardı 10^{-5} ila 10^{-10} M'lık aralıkta suyla seyreltildi ve sıralı seyreltiler oluşturuldu.
3. Hücre süspansiyonuna (50 µL'lik) kaynatılmış 100 mM Tris ve 4 mM EDTA 1:9 oranında eklendi ve 2 dk 100 °C'de inkübe edildi. 1000 x g 'de 60s örnek santrifüj edildi ve süpernatan temiz bir tüpe aktarıldı. Örnekler ölçüm yapılıncaya kadar buz üstünde tutuldu.
4. Örnekler/standartlar bir ATP kuyucuğu ya da tüpüne transfer edildi.
5. Tüplere 50 µL Lüsiferaz reaktifi eklendi ve 10s içerisinde ölçüm yapıldı.
6. ATP konsantrasyonları standart eğri kullanılarak hesaplandı.

ATP Üretim Potansiyelinin Tespiti

Çalışmaya dahil edilen obez hasta ve kontrol grubunun ATP üretim potansiyeli ölçmek için, ATP kit prosedürü uygulanan her bir örnek başına 5µL ADP (final konsantrasyonu 200 µM) eklendi ve 2 dakika bekletildikten sonra tekrar ATP seviyelerini ölçümü luminometrik yöntem kullanılarak yapıldı.

Protein Miktar Tayini (Lowry-Hartree Modifiye Yöntemi)

Protein miktar analizi, yağ dokusunda Lowry yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Protein tayini için miktarı bilinen ve artan oranlarda elde edilen sığır serum albümini dokuz örnek içine konuldu ve diğer örneklere de protein miktarı analiz edilecek homojenize edilmiş yağ dokusu hücreleri konuldu. Örnek hacminin 90µl'ye getirilmesi için üstlerine distile su eklendi. Proteinler 50µl 2N NaOH içinde 37°C'de 30 dakika kadar bekletildi. Sonrasında örneklerin üstüne 1ml Çözelti A eklendi ve 10 dakika 20°C'de bekletildi ve son olarak örneklerin üstüne 100ml Çözelti B eklenerek 37°C'de 30 dakika kadar bekletilen örneklerin 750 nm'deki absorbans değerleri okundu. İlk olarak standartların eklenmiş olduğu örneklerin 750 nm'de ölçümü yapılıp, vermiş oldukları değerler doğrultusunda protein miktarının bir işlevi olan standart doğru çizildi. Bu doğru kullanılarak protein miktarları bilinmeyen yağ dokusu hücrelerinin 750 nm'deki okuma değerlerinin karşılığı bulunarak protein hesaplaması yapıldı.

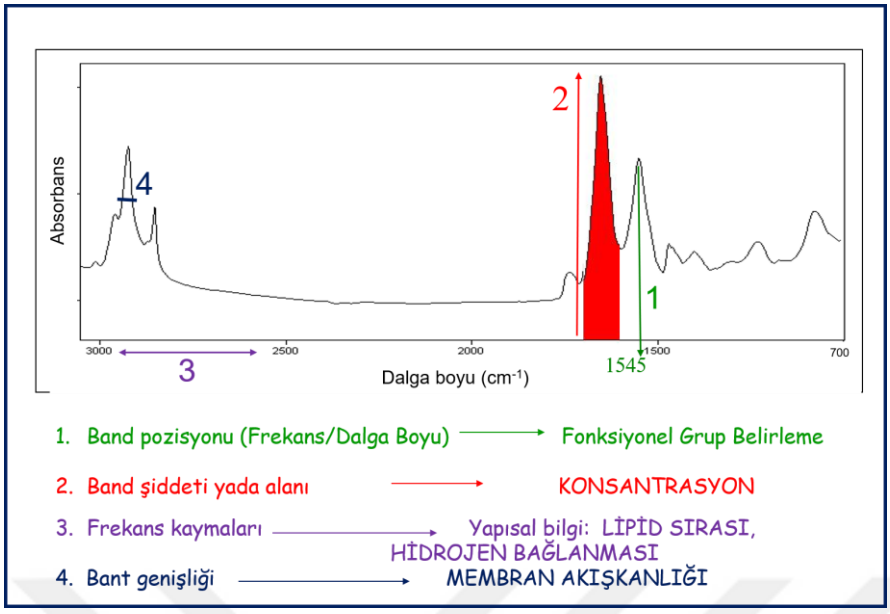
Çözelti (A): 50 ml % 2 NA_2CO_3 + 1 ml $CuSO_4$ 5 H_2O + 1 ml % 2 Potasyum Sodyum Tartarat)

Çözelti (B): Folin ve Ciocalteau'nun fenol reagenti + H_2O (1:1) (modifiye edilmiş Lowry: Lowry 1951; Hartree 1972)

3.1.10. FTIR (Fourier Kızılötesi Dönüşümü)

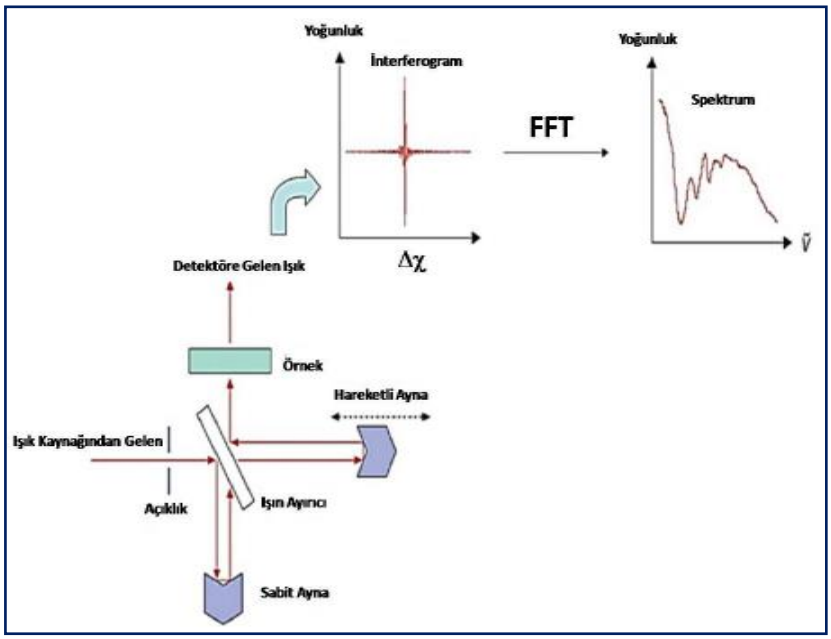
FTIR spektroskopisi, araştırma aşamasında olan materyallerin bileşiminde yer alan farklı yapısal ve fonksiyonel özelliğe sahip gruplarının incelenmesi için kullanılan bir tekniktir. Bu teknik ile incelenmek istenen örneğin fonksiyonel gruplarının detaylı analizi yapılmaktadır. Belirli biyolojik özelliklere sahip parmak izi niteliğindeki bilgiler fonksiyonel grupları oluşturan yapıların içerik bilgilerinin de daha net analiz edilmesini sağlamaktadır. Analiz çalışmaları yapılırken; doğru bantların tanımlanması, araştırılan bantların bulunduğu konum, bant şiddetleri, bantların altında kalan alan ve bant genişlikleri belirleyici olmaktadır (Şekil 3.1).

Biyolojik doku bileşenlerine ait fonksiyonel gruplardaki değişiklikleri tespit eden tekniklerden biri FTIR spektroskopisidir. Uyarılmış spektral verilere farklı kemometrik yöntemlerin uygulanması, FTIR spektroskopisinin hastalık tanısında kullanılmasında önemlidir. ATR-FTIR spektroskopisinde bir IR ışını tipik olarak IR saydam kristal boyunca (ZnSe veya Ge) iç yüzeyde bir veya birkaç iç yansımanın yer alacağı şekilde yönlendirilir. Bu giderek azalan veya kristal ve çevresindeki hava sınırına yakın alanda duran bir dalga oluşturur. Örnekler doğrudan ATR kristalinin yüzeyinde hazırlanırsa, absorbsiyon özellikleri dalganın giderek zayıflaması sonucunda gözlenebilir. Işımanın etki derinliği dalga boyuna bağlıdır ve dalga boyu; geliş açısı, kristal malzemenin ve numunenin kırılma endeksleri gibi faktörlere bağlıdır (Şekil 3.2). (Baloğlu 2015, Baloğlu 2017)

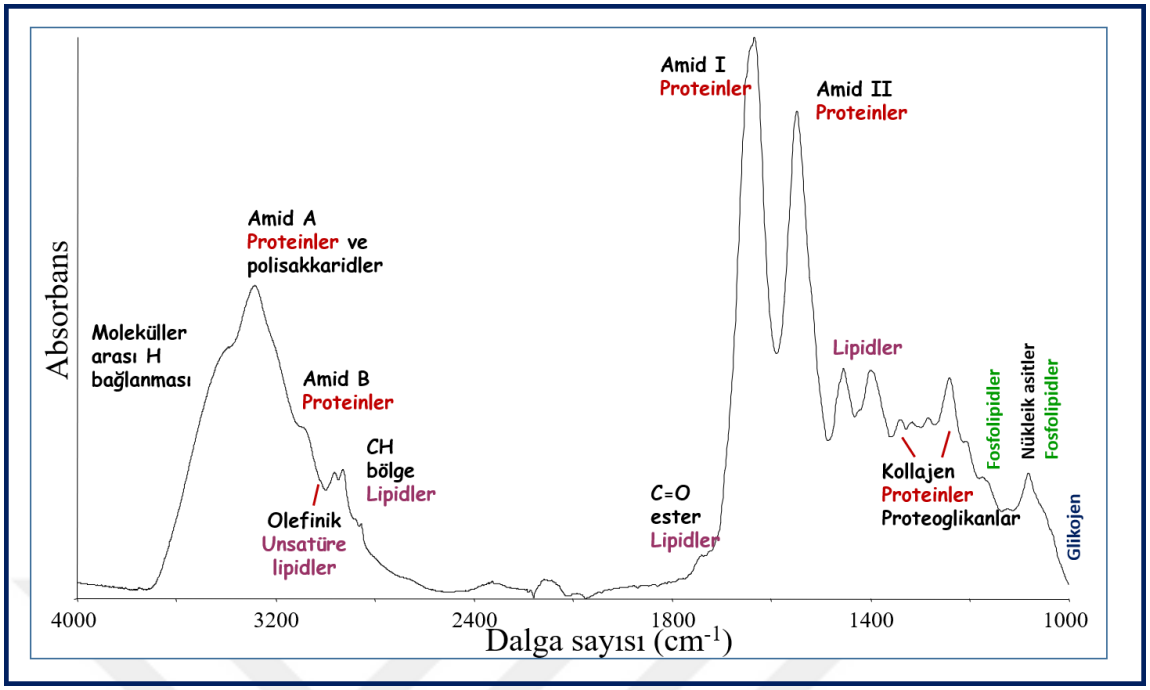


Şekil 3.1: Spektral Parametreler

Bu teknik ile materyalin yapısında bulunan protein, lipid, DNA, RNA, karbonhidrat gibi moleküllerin fonksiyonel gruplarının incelemesi detaylı olarak yapılmaktadır. Bu fonksiyonel gruplardaki değişimler ve bu değişimler sonucu oluşan yapısal farklılıklarda detaylandırılabilmektedir. FTIR spektroskopisiyle incelenen önemli bir parametre, lipitlerin diğer biyomoleküllerle etkileşimidir. Bu veri özellikle lipid konfigürasyonunda değişiklik olması beklenen metabolik hastalıkların incelenmesi açısından önemlidir (Şekil 3.3). (Bozkurt 2010)



Şekil 3.2 : ATR-FTIR spektroskopisi



Şekil 3.3: FTIR spektroskopisi bant dağılımı

Yağ dokusundaki makromoleküler kompozisyon hakkında nicel bilgi edinmek için de ATR-FTIR spektroskopisi kullanılır. Farklı dokulardaki moleküler tanımlama ve kompozisyon değişikliklerini tanımlamak için, yağın proteine oranı ve kollajen bütünlüğü de değerlendirilebilir. Obezite durumunda adipoz doku genişlemesi, doku sertleşmesi ve fibrozise katkıda bulunan artmış kollajen içeriğidir.

Bu teknikte her piksel sırayla kaydedilen bir spektrum içerir ve pikseller daha büyük görüntü meydana getirmek için bir araya toplanır.

FTIR spektroskopisinde 3006-1047 cm^{-1} spektral aralıkta yer alan bantların isimleri Tablo 3.2 ‘te görülmektedir. Bu bantların bant şiddetleri ve bant yerleşimleri gruplar arası makromoleküler yapıların karşılaştırılmasında kullanılmaktadır.

Tablo 3.2: Reprodüktif yağ dokusunun FTIR spektrumlarında genel bant atamaları

Bant No	Dalga boyu (cm^{-1}) Epididim yağ dokusu	Atanan spektral değerlerin açıklaması
1	3006	Olefinik = CH gerilme titreşimi: lipit (özellikle doymamış)
2	2957	CH_3 asimetrik gerilme: proteinlerden, karbonhidratlar ve nükleik asitlerin küçük katkısıyla esas olarak lipid
3	2922	CH_2 asimetrik gerilme: proteinlerden, karbonhidratlar ve nükleik asitlerin küçük katkısıyla esas olarak lipid
4	2853	CH_2 asimetrik gerilme: proteinlerden, karbonhidratlar ve nükleik asitlerin küçük katkısıyla esas olarak lipid
5	1743	Ester C = O gerilme: trigliseritler, kolesterol esterleri
6	1646	Amid I (protein C = O gerilmesi)
7	1550	Amid II (protein N - H bükülme, C – N gerilme)
8	1464	CH_2 bükülme titreşimi: lipitler
9	1340	Kollajen CH_2 yan zincir titreşimleri
10	1320	Kollajen
11	1280	Kollajen
12	1160	Trigliseritlerin gliserol iskeletinin C-O bağının gerilme titreşimi
13	1047	C-O gerilme bandı, C-OH glikojen gruplarındaki C-O bükülmesi ile birleştiğinde

3.1.11. FTIR Veri Toplama

Yağ dokusundan kesitler alınarak, ZnSe ATR kristali (ATR aksesuarı ile donatılmış Perkin Elmer Inc. Norwalk, CT, ABD) üzerine yerleştirildi. Kristal üzerindeki numuneler 5 dk boyunca hafif N2 akışı ile kurutuldu. Örnekler 4000- 650 cm^{-1} spektral aralıkta 4cm¬ çözünürlükte tarandı. Her örnek için 3 tarama yapıldı ve bu taramaların ortalaması analiz için kullanıldı. Doku örneklerinin taranması ile elde edilen veriler OPUS programı ile analiz edildi. Doku örneklerinin ortalama bant verilerine ikinci türev işlevi uygulandı. İkinci türev işlevi, spektrumdaki taban çizgisi değişkenliğinin ve arka plan etkilerini en aza indirmek için yapıldı. İkinci türev işleminin dışında, örnek kalınlığı değişimlerinden kaynaklanabilecek farklılıkları gidermek için vektör normalizasyonu kullanıldı. Bu işlem, hemen hemen aynı olan absorbans değerlerindeki değişkenlikten emin olmak ve deneysel koşullarda örnek içi değişkenlik ve değişkenlikten etkilenebilecek deneysel hataları en aza indirmek için uygulandı. 4000-650 cm^{-1} spektral

aralıkta lipid ve protein bantlarının bulunması gereken bölgelerdeki bant şiddetlerinin ölçümü yapıldı, bant pozisyonları ve bant kaymaları karşılaştırıldı.

FTIR spektroskopisinde bant şiddetleri dışında değerlendirilen parametreler; lipid/protein oranı, lipid peroksidasyonu, doymuş-doymamış lipid oranıdır (Tablo 3.3). Bu parametrelerin incelenmesi ile lipid ve protein metabolizmasında değişen makromoleküler yapıya bağlı olarak meydana gelen değişiklikler ortaya çıkarılmaktadır.

Tablo 3.3: IR spektral sınır değerlerine genel bakış

	Bant alan sınırları
Özellik	**Epididim yağ dokusu**
$\mathbf{A_{LİPİD}}$	$A_{3006}+A_{2957}+A_{2922}+A_{2853}+A_{1743}+A_{1464}+A_{1160}$
	A_{3006} : A [2997:3017] cm^{-1}
	A_{2957} : A [2950:2966] cm^{-1}
	A_{2922} : A [2905:2936] cm^{-1}
	A_{2853} : A [2840:2861] cm^{-1}
	A_{1743} : A [1730:1760] cm^{-1}
	A_{1464} : A [1454:1474] cm^{-1}
	A_{1160} : A [1133:1200] cm^{-1}
$\mathbf{A_{SATL}}$	$A_{2922}+A_{2853}$
	A_{2922} : A [2905:2936] cm^{-1}
	A_{2853} : A [2840:2861] cm^{-1}
$\mathbf{A_{UNSATL}}$	A_{3006} : A [2997:3017] cm^{-1}
$\mathbf{A_{PROT}}$	A_{1550} : A [1506:1571] cm^{-1}
doymuş/doymamış lipid oranı	$(A_{2922}+A_{2853})/A_{3006}$
açil zincir uzunluğu	A_{2922}/A_{2957}
lipid/protein oranı	$(A_{3006}+A_{2957}+A_{2922}+A_{2853}+A_{1743}+A_{1464}+A_{1160})/(A_{1550}+A_{1340}+A_{1320}+A_{1280})$

$A_{LİPİD}$: toplam lipid, A_{SATL}: doymuş lipid, A_{UNSATL}: doymamış lipid, A_{PROT}: toplam protein.

3.1.12 İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi Kruskal Wallis karşılaştırma analizi kullanılarak Graph Pad 8 istatistik program ile yapılmıştır. Mann-Whitney U testleri kullanılarak gruplar arasındaki anlamlılıklar incelenmiş, Spearman korelasyon testi ile değişkenler arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiş olup, anlamlılık düzeyi için $p<0,05$ değeri kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Grupların Demografik Verileri

Çalışmamızda obezite tanısı konmuş BKİ'si 35 kg/m²'nin üstünde olan diyabeti olan/olmayan obez hastalardan morbid ameliyatı sırasında alınan yağ dokusu ile çalışılmıştır. Yaş ve cinsiyet hasta ve kontrol grubu arasında belirleyici ve sınırlayıcı bir kriter olmamasına rağmen BKİ iki grup arasında anlamlı fark (p <0,0001) oluşturan bir parametre olarak gözlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Hasta ve kontrol gruplarının demografik verilerinin değerlendirmesi

	Hasta Diyabet (-) (n=23)	**Hasta Diyabet (+) (n=20)**	**Kontrol Diyabet (-) (n=7)**	**Kontrol Diyabet (+) (n=6)**	**Hasta (n=43)**	**Kontrol (n=13)**
Yaş	54,04±9,97	48,80±13,40	51,83±9,23	46,14±13,36	48,58±13,63	46,33±11,13
Cinsiyet (E/K)	14/9	9/11	2/5	3/3	23/20	5/8
Beden Kitle Endeksi (kg/m²)	39,50±2,73	39,31±2,88	25,50±4,14	21,40±2,88	39,44±2,76[a]*	24,13±4,17

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. [a]Hasta grubuna göre kontrol grubu karşılaştırması, *p<0,0001.

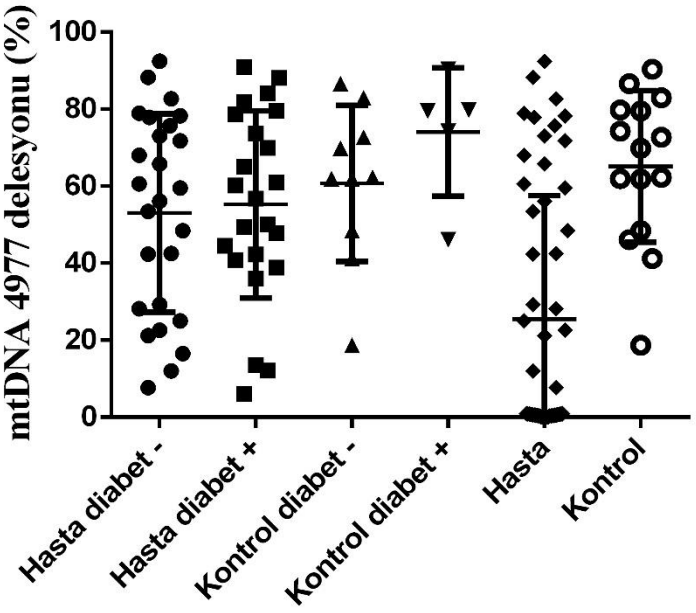
4.2. Delesyon Taraması

Yağ dokusu hücreleri olan adipositlerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra elde edilen örneklerde PZR yöntemi uygulanmıştır. mtDNA 4977 delesyon düzeyi; delesyona uğrayan mtDNA kopya sayısının, toplam mtDNA kopya sayısına göre yüzde oranı hesaplanarak tespit edilmiştir. Mt4977 delesyonu açısından hasta ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, iki grup arasında delesyona rastlanma oranı arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,087) (Tablo 4.2; Şekil 4.1).

Tablo 4.2: Hasta ve kontrol gruplarına ait MtDNA4977 delesyonu verileri

	Hasta Diyabet (-) (n=23)	Hasta Diyabet (+) (n=20)	Kontrol Diyabet (-) (n=7)	Kontrol Diyabet (+) (n=6)	Hasta (n=43)	Kontrol (n=13)
Mt4977 DEL (%)	53,02± 25,76	55,28±24,30	60,68±20,26	74,04 ±16,66	54,08±24,85	65,13± 19,64

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.1: Hasta ve kontrol grubuna dahil bireylerin mtDNA 4977 delesyon taraması. Delesyon yüzdelerinin dağılımı

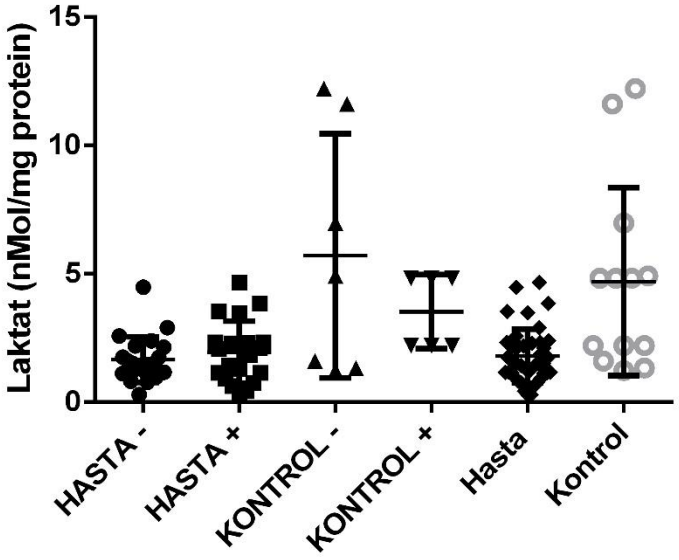
4.3. Yağ Dokusu Laktat Seviyeleri

Çalışmaya dahil edilen BKİ 35'in üzerinde olan obezite tanısı konmuş hasta ve kontrol grubuna dahil bireylerin yağ dokuları uygun buffer kullanılarak homojenize edilmiş, elde edilen homojenatta ilgili Laktat kiti kullanılarak iki grubun laktat miktarları spektrofotometrik yöntemi ile tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubu laktat düzeyleri açısından incelendiğinde iki grup arasında laktat seviyeleri açısından anlamlı (p=0,001) fark bulunmuştur. Diğer grupların değerlendirilmesinde istatistiksel anlamlılık gözlenmedi (Tablo 4.3; Şekil 4.2).

Tablo 4.3 : Hasta ve kontrol gruplarına ait Laktat seviyeleri

	Hasta Diyabet (-) (n=23)	Hasta Diyabet (+) (n=20)	Kontrol Diyabet (-) (n=7)	Kontrol Diyabet (+) (n=6)	Hasta (n=43)	Kontrol (n=13)
Laktat (nMol/mg protein)	2,56± 4,42	1,94±1,20	5,70±4,75	3,52 ±1,44	2,27±3,32[a]*	4,69± 3,66

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. [a]Hasta grubuna göre kontrol grubu karşılaştırması, *p<0,0001.



Şekil 4.2: Hasta ve kontrol grubuna dahil bireylerin ortalama laktat miktarlarının dağılımı.

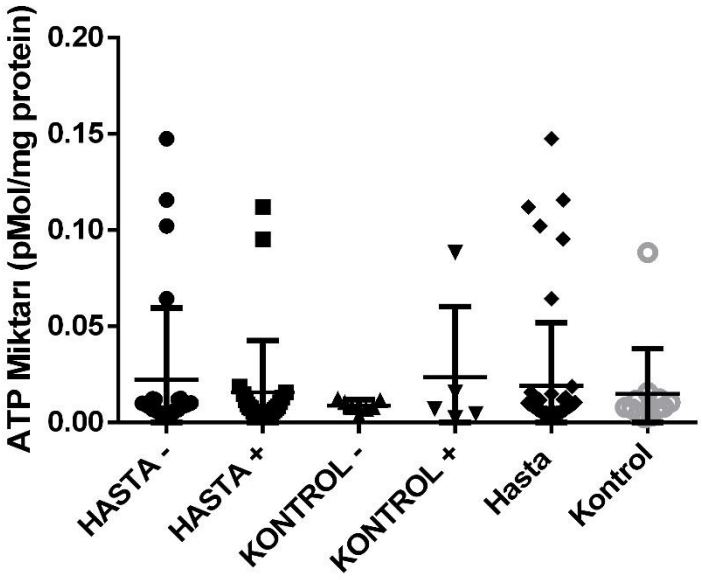
4.4. Yağ Dokusu ATP Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen obez hasta ve kontrol grubundan yer alan kişilerin adiposit hücrelerinde, ATP düzeyleri kit kullanılarak luminometrik yöntem ile ölçüldü. Adipositlerde ATP seviyeleri Kruskal Wallis testiyle karşılaştırıldığında, hasta ve kontrol grubu arasında ATP düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,95) (Tablo 4.4; Şekil 4.3).

Tablo 4.4: Hasta ve kontrol gruplarına ait ATP analizi sonuçları

	Hasta Diyabet (-) (n=23)	**Hasta Diyabet (+)** (n=20)	**Kontrol Diyabet (-)** (n=7)	**Kontrol Diyabet (+)** (n=6)	**Hasta** (n=43)	**Kontrol** (n=13)
ATP (pMol/mg protein)	22,23± 37,34	15,72±26,92	8,75±3,15	23,66 ±36,59	19,16±32,70	14,96± 23,48

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.3: Hasta ve kontrol grubunda ATP düzeylerinin dağlımı

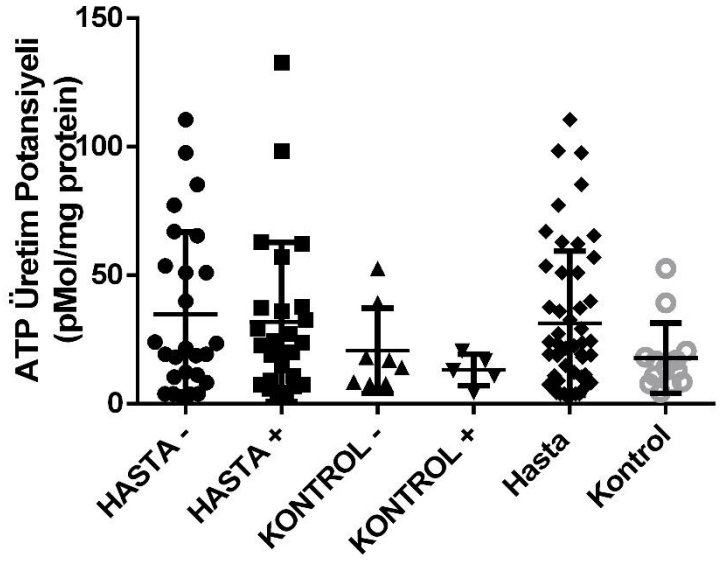
4.5. Yağ Dokusu ATP Üretim Potansiyeli Analizi Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen obez hasta ve kontrol grubunun ATP üretim potansiyeli ölçmek için, ATP kit prosedürü uygulanan her bir örnek başına 5µL ADP eklenmiş ve 2 dakika bekletildikten sonra tekrar ATP seviyelerini ölçümü luminometrik yöntem kullanılarak yapılmıştır. Grupların değerlendirilmesinde istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir (Tablo 4.5; Şekil 4.4).

Tablo 4.5: Hasta ve kontrol grubu ATP üretim potansiyelleri değerlendirilmesi

	Hasta Diyabet (-) (n=23)	**Hasta Diyabet (+)** (n=20)	**Kontrol Diyabet (-)** (n=7)	**Kontrol Diyabet (+)** (n=6)	**Hasta** (n=43)	**Kontrol** (n=13)
ATP Üretim Potansiyeli (pMol/mg protein)	34,80± 31,97	31,80±30,96	20,66±16,56	13,16 ±6,12	31,34±28,06	17,78± 13,67

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.



Şekil 4.4: Hasta ve kontrol grubunda ATP üretim kapasitelerinin dağılımı

4.6. Hasta ve Kontrol Grubu Arasında Delesyona Bağlı ATP, ATP Üretim Potansiyeli ve Laktat Seviyeleri Arasındaki Korelasyonun İncelenmesi

MtDNA 4977 delesyonu mitokondri fonksiyonu üstündeki etkileri göz önüne alındığında ATP üretim sürecinin dengesinin değiştirebilecek bir durumdur. Tüm hasta ve kontrol grubuna dahil bireylerin yüzde olarak belirlenen mtDNA 4977 delesyon seviyeleri ile ATP, ATP üretim potansiyeli ve Laktat düzeyleriyle arasındaki ilişki Tablo 4.6'da verilmiştir. Hasta ve kontrol grubunda delesyon parametresi ve ATP, ATP üretim potansiyeli, Laktat seviyelerinin korelasyonu incelendiğinde, hasta ve kontrol grubu

arasında delesyona bağlı belirtilen parametrelerde değişiklik olmadığını belirlenmiştir. Diyabet parametresi göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede grup içi incelenen belirteçler arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 4.7).

Tablo 4.6: MtDNA 4977 Delesyonu ile ATP, ADP, Laktat seviyeleri arasındaki korelasyon ilişkisi

	Hasta	Kontrol
MtDNA 4977 Delesyonu/ATP	p=0,37 r=0,12	p=0,89 r=-0,03
MtDNA 4977 Delesyonu /ATP üretim potansiyeli	p=0,78 r=0,04	p=0,63 r=0,13
MtDNA 4977 Delesyonu /Laktat	p=0,95 r=-0,01	p=0,41 r=0,31

(Spearman Korelasyonu)

Tablo 4.7: MtDNA 4977 Delesyonu / ATP, ADP, Laktat seviyeleri arasındaki korelasyon verileri (Diyabet parametresi gözönüne alınarak yapılan değerlendirme)

	Hasta Diyabet (+)	Hasta Diyabet (-)	Kontrol Diyabet (+)	Kontrol Diyabet (-)
MtDNA 4977 Delesyonu /ATP	p=0,71 r=-0,07	p=0,42 r=0,16	p= 0,79 r=0,15	p=0,86 r=0,06
MtDNA 4977 Delesyonu /ATP üretim potansiyeli	p=0,37 r=0,18	p=0,89 r=0,02	p=0,33 r=-0,55	p=0,38 r=0,33
MtDNA 4977 Delesyonu /Laktat	p=0,70 r=0,08	p=0,90 r=-0,02		

(Spearman Korelasyonu)

4.7. Hasta ve Kontrol Grubu Arasında mtDNA4977 delesyonu/mitokondri kopya sayısı ile ATP, ATP Üretim Potansiyeli ve Laktat Seviyeleri Arasındaki Korelasyonun İncelenmesi

Hasta ve kontrol grubunda göre mtDNA4977 delesyonu/mitokondri kopya sayısı ile ATP, ATP üretim potansiyeli, Laktat seviyeleri arasındaki korelasyon incelenmiştir. Diyabet parametresi göz önüne alınmadan yapılan değerlendirmede, kontrol grubunda mtDNA4977 delesyonu/mitokondri kopya sayısı ile ATP arasında anlamlı bir ilişki

olduğu belirlenmiştir (p=0,03; r=0,58). Diğer belirteçler açısından değerlendirildiğinde anlamlı değişim olmadığı dikkati çekmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: mtDNA4977 delesyonu/mitokondri kopya sayısı ile ATP, ADP, Laktat seviyeleri arasındaki korelasyon verileri (Diyabet parametresi göz önüne alınmadan yapılan değerlendirme)

	Hasta	**Kontrol**
mtDNA4977 delesyonu/mitokondri kopya sayısı ile ATP	p=0,15 r=0,21	p=0,03* r=0,58
mtDNA4977 delesyonu/mitokondri kopya sayısı ileATP üretim potansiyeli	p=0,42 r=-0,11	p=0,88 r=0,04
mtDNA4977 delesyonu/mitokondri kopya sayısı ile Laktat	p=0,46 r=-0,12	p=0,40 r=0,31

(Spearman Korelasyonu)

Diyabet parametresi göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede, kontrol grubunda mtDNA4977 delesyonu/mitokondri kopya sayısı ile ATP arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir (p=0,01; r=0,76). Diğer belirteçler açısından değerlendirildiğinde anlamlı değişim olmadığı dikkati çekmiştir (Tablo 4.9).

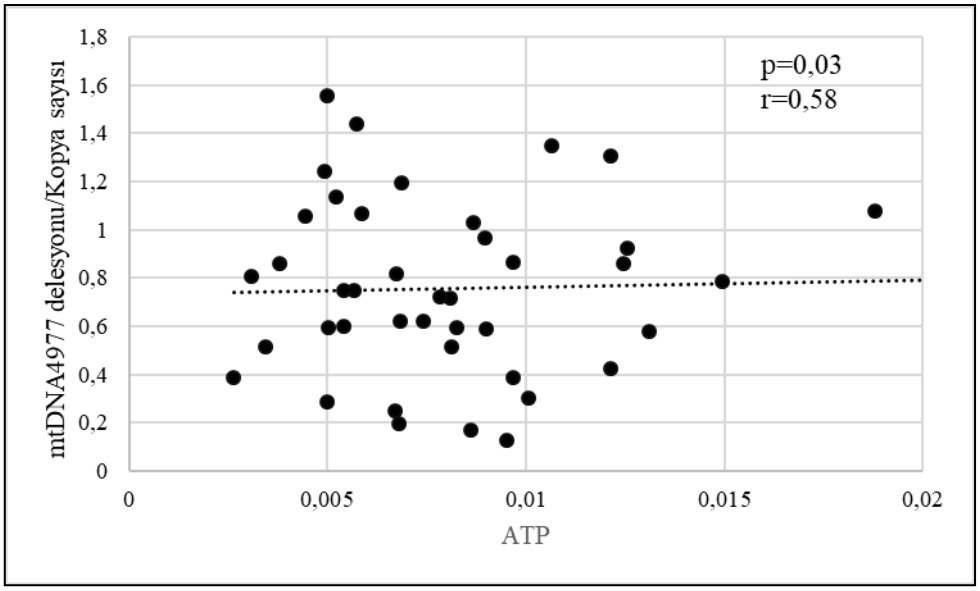
Tablo 4.9: mtDNA4977 delesyonu/ mitokondri kopya sayısı ile ATP, ADP, Laktat seviyeleri arasındaki korelasyon verileri (Diyabet parametresi göz önüne alınarak yapılan değerlendirme)

	Hasta Diyabet (+)	**Hasta Diyabet (-)**	**Kontrol Diyabet (+)**	**Kontrol Diyabet (-)**
mtDNA4977 delesyonu/ mitokondri kopya sayısı /ATP	p=0,89 r=0,02	p=0,30 r=0,21	p=0,68 r=0,25	p=0,01* r=0,76

mtDNA4977 delesyonu/mitokondri kopya sayısı /ATP üretim potansiyeli	p=0,83 r=0,04	p=0,45 r=-0,15	p=0,23 r=-0,65	p=0,66 r=0,16
mtDNA4977 delesyonu/mitokondri kopya sayısı /Laktat	p=0,32 r=0,21	p=0,51 r=-0,14		p=0,21 r=0,53

(Spearman Korelasyonu)

Şekil 4.5'de Kontrol grubu mtDNA4977 delesyonu/kopya sayısı ile ATP düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkisi verilmiştir. mt DNA 4977 delesyonu/Kopya sayısı ile ATP miktarlarının artışı farklı dengeleme mekanizmalarının etkili olabileceğini göstermektedir. Bu dengeleme mekanizmaları hakkında fikir sahibi olmak adına iki grup arasında mitokondri kopya sayıları karşılaştırılmıştır. Hasta ve kontrol grupları mitokondri kopya sayıları açısından karşılaştırıldığında anlamlı değişim olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4.10).

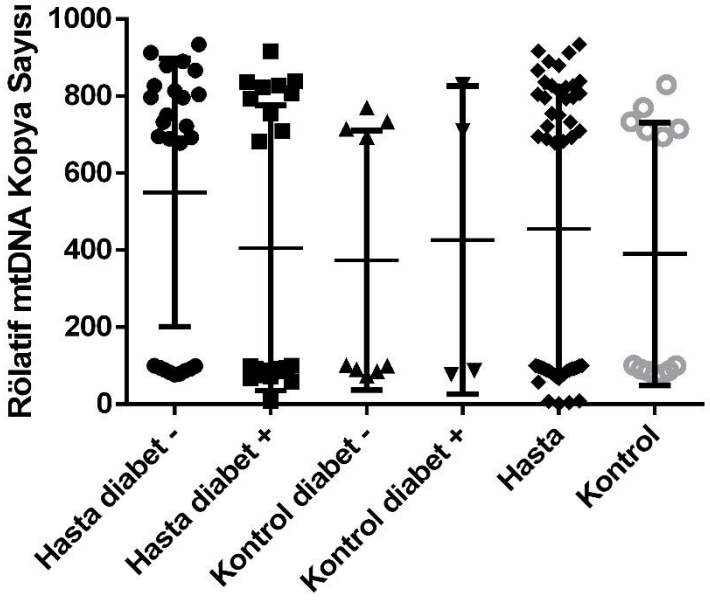


Şekil 4.5: mtDNA4977 delesyonu/kopya sayısı ile ATP düzeyleri arasındaki korelasyon

Tablo 4.10: Mitokondri Kopya Sayısı Karşılaştırılması

	Hasta Diyabet (-) (n=23)	**Hasta Diyabet (+)** (n=20)	**Kontrol Diyabet (-)** (n=7)	**Kontrol Diyabet (+)** (n=6)	**Hasta** (n=43)	**Kontrol** (n=13)
Rölatif Mitokondriyal DNA Seviyesi (%)	549,6±348,2	405,8±370,7	374,0±336,8	426,1±400,3	455,5±369,1	390,0±341,0

Şekil 4.6'da obez hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin PZR sonrası DNA miktarları (nanodrop) karşılaştırmak suretiyle mtDNA/β globin düzeyleri verilmiştir. Mitokondri kopya sayısı β globin göre rölatif olarak belirlenmiştir. İki grubun diyabet parametresine göre ayrılmış gruplarında mitokondri kopya sayısının dağılımı gösterilmiştir.



Şekil 4.6: Mitokondri kopya sayısı dağılımı

4.8. FTIR Sonuçları

Hasta ve kontrol grubu lipid ve protein bantları açısından değerlendirildiğinde; Amid-1 bandı iki grup arasında anlamlı farklılık göstermektedir. Delesyon oranı baz alınarak yapılan gruplandırmada delesyonun yüksek ve düşük olmasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında lipid ve protein miktarı üstüne etkisinin olmadığı saptanmıştır (Tablo 4.11).

Hasta ve kontrol grubu lipid/protein miktarı ve açil zincir uzunluğu açısından değerlendirildiğinde; iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Doymamış/Doymuş Lipid oranı iki grup arasında karşılaştırıldığında anlamlı fark tespit edilmiştir (Tablo 4.12).

Tablo 4.11: Lipid ve protein bant verileri

	Hasta (n=43)	Kontrol (=13)	Hasta Del (↑)	Hasta Del (↓)	p
3017-3000 Unsat.	0,12±0,07	0,20±0,15	0,13±0,07	0,10±0,08	0,212* 0,393** 0,240***
2975-2952 Lipid CH_3 As.	0,32±0,09	0,35±0,16	0,32±0,09	0,33±0,10	0,873* 0,937** 0,900***
2943-2910 Lipid CH_2As.	4,771±1,856	5,90±3,42	4,93±1,58	4,61±2,23	0,682* 0,937** 0,588***
2877-2868 Lipid CH_3Sim.	0,016±0,008	0,01±0,007	0,01±0,007	0,020±0,008	0,279* 0,846** 0,101***
2865-2841 Lipid CH_2Sim.	2,76±1,23	3,45±2,009	2,84±0,80	2,69±1,63	0,820* >0,999** 0,699***
1765-1731 Ester	4,82±2,67	6,63±3,25	4,84±1,46	4,81±3,68	0,249* 0,393** 0,309***
1700-1592 Amid-1	78,15±2,46	75,21±3,69	78,56±2,85	77,73±2,19	0,003* 0,064** 0,093***

1577-1498 Amid-2	24,69±4,22	22,44±5,03	23,49±3,34	25,89±4,96	0,384* 0,588** 0,393***
1478-1435 Lipid	6,71±1,10	6,90±1,82	6,74±0,81	6,69±1,42	0,891* >0,999** 0,818***
1181-1131 Lipid	3,60±1,88	4,96±2,16	3,46±1,10	3,75±2,56	0,179* 0,240** 0,309***

* Hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel analiz
** Delesyon oranı yüksek hasta grubu ve kontrol grubu arası analiz
*** Delesyon oranı düşük hasta grubu ve kontrol grubu arası analiz

Hasta Delesyon(↑): Delesyon oranı %82'den yüksek

Hasta Delesyon(↓): Delesyon oranı %16'dan düşük

Tablo 4.12: Yüksek delesyonlu ve düşük delesyonlu hastaların Lipid/Protein , Açil zincir uzunluğu, Doymamış/Doymuş Lipid oranı verileri

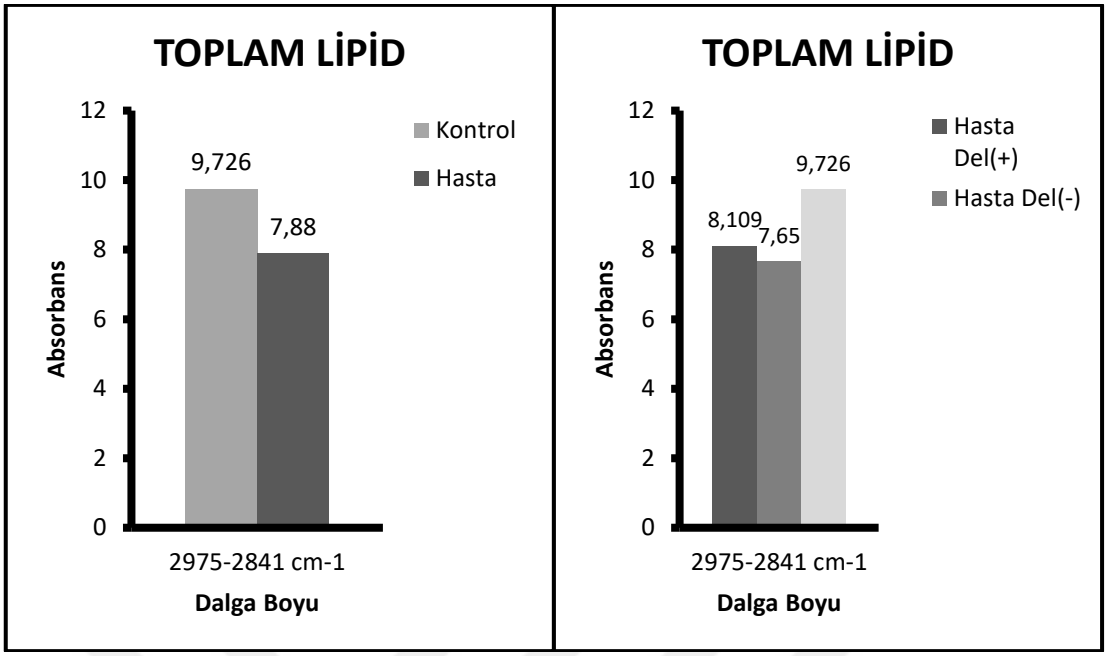
	Hasta (n=43)	**Kontrol (n=13)**	**Hasta Del (↑)**	**Hasta Del (↓)**	**p**
Lipid/ Protein	0,07±0,03	0,09±0,05	0,07±0,02	0,07±0,04	0,568* 0,937** 0,419***
Acil zincir uzunluğu	14,76±3,66	15,74±2,89	15,50±1,99	14,03±4,92	0,616* 0,818** 0,588***
Doymamış/ Doymuş Lipid Oranı	0,014±0,006	0,002±0,0045	0,016±0,006	0,013±0,007	0,054* 0,192** 0,060***

P; *: Hasta/kontrol, **: delesyon yüksek hasta/kontrol, ***: delesyonu düşük hasta/kontrol

Hasta Delesyon(↑): Delesyon oranı %82'den yüksek

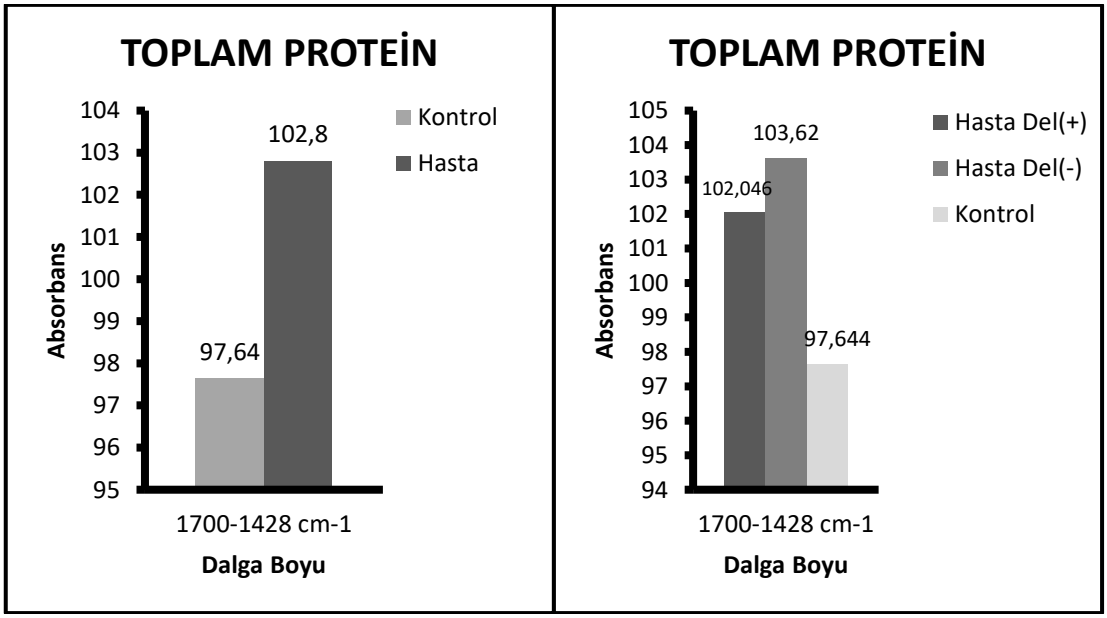
Hasta Delesyon(↓): Delesyon oranı %16'dan düşük

Hasta ve kontrol grubu toplam lipid miktarı açısından değerlendirildiğinde, kontrol grubunun lipid miktarı yüksek olmasına rağmen ortalama veriler gözönüne alındığından iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir (p=0,682) (Şekil 4.7).



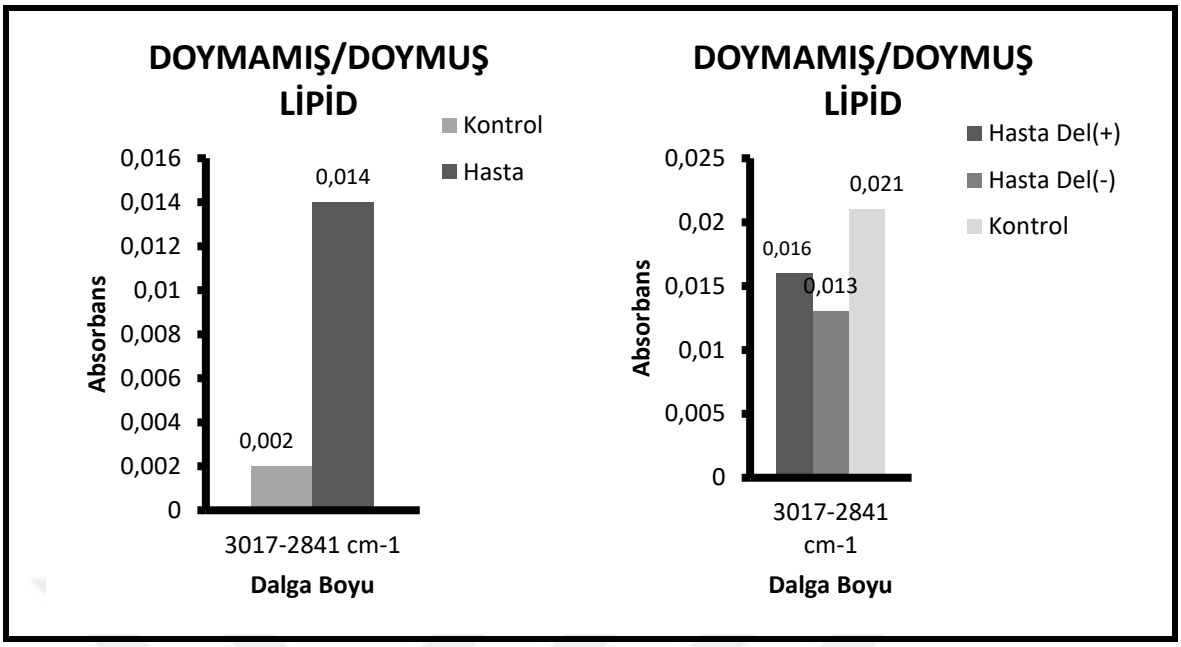
Şekil 4.7: Toplam lipid değerlendirmesi

Hasta ve kontrol grubu toplam protein miktarı açısından değerlendirildiğinde, hasta grubunun protein miktarı yüksek olmasına rağmen ortalama veriler gözönüne alındığından iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir (p=0,179) (Şekil 4.8).



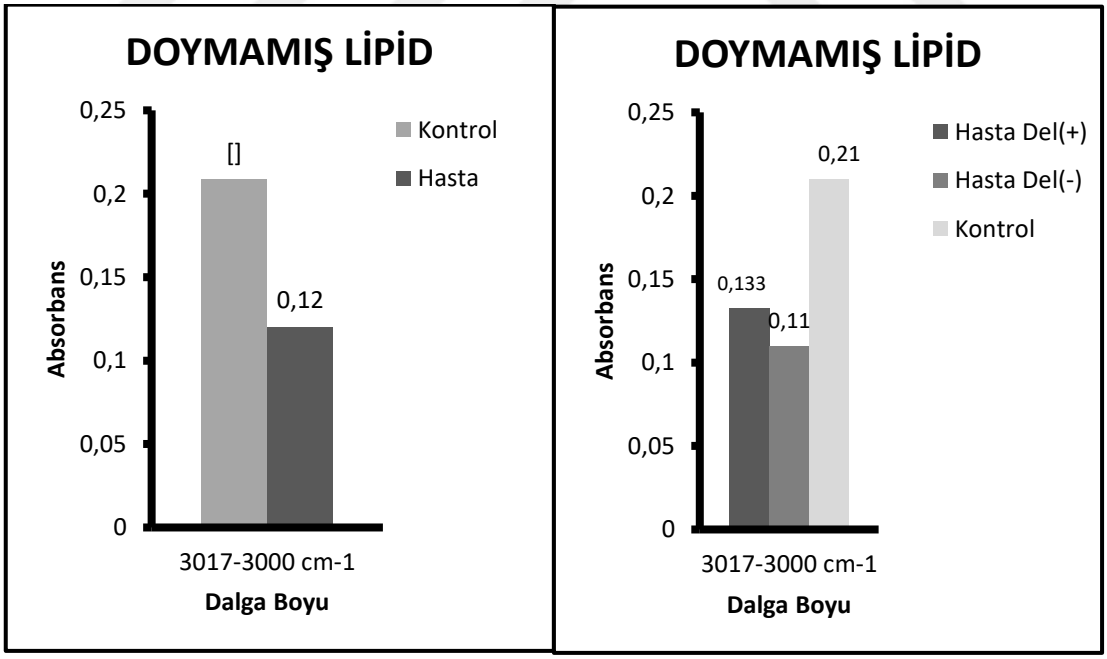
Şekil 4.8: Toplam protein değerlendirmesi

Doymamış/doymuş lipid oranları açısından değerlendirildiğinde iki grup arasında anlamlı fark olduğu belirlenmiştir (P=0,05) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Doymamış/Doymuş lipid oranı değerlendirmesi

Doymamış lipid miktarı açısından değerlendirildiğinde, iki grup arasında doymamış yağ asidi miktarı açısından fark olmadığı belirlenmiştir (p=0,21) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Doymamış lipid değerlendirmesi

4.9. FTIR Band Kayması

Hasta ve kontrol grubu lipid ve protein bantlarının pozisyonu gözönüne alınıp karşılaştırıldığında, doymamış lipid bandında hasta ve kontrol grubu; delesyon oranı

düşük hasta grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı oranda bant kayması tespit edilmiştir. (p= 0,05*, p=0,03) Yine CH2 asimetrik bandı olarak da isimlendirilen lipid bandı yerleşiminde de hasta ve kontrol grubu arasında belirgin bir kayma gerçekleştiği gözlenmiştir. (p=0,037) 1160 bandı olarak isimlendirilen lipid bandı yerleşimi açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark belirlenmiş, hasta grubunda bant lokalizasyonunda belirgin bir kayma tespit edilmiştir. (P=0,02) Tüm lipid bandı kaymaları değerlendirildiğinde, özellikle hasta ve kontrol grubu arasında lipid yapı ve fonksiyonu açısından farklılık olduğunu görülmektedir (Tablo 4.13; Şekil 4.11; Şekil 4.12).

Hasta ile kontrol grupları istatistik verileri Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi.

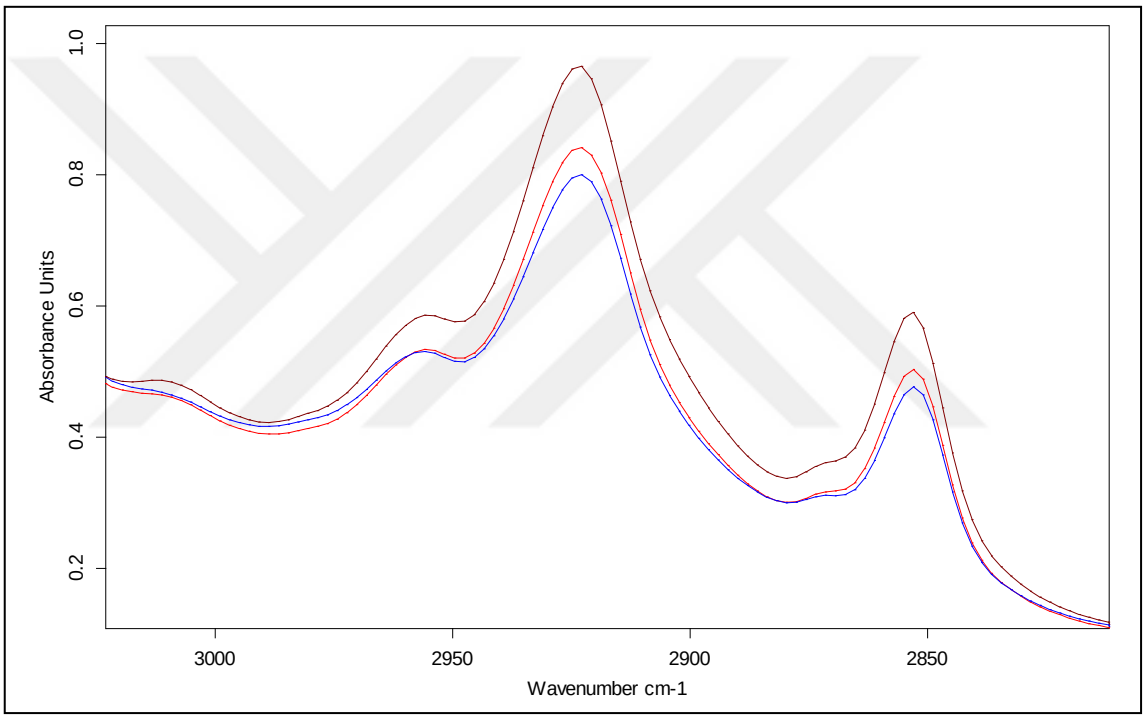
Tablo 4.13: FTIR bant kaymalarının verileri

	Hasta (43)	**Kontrol (13)**	**Hasta Del (↑)**	**Hasta Del (↓)**	**p**
Doymamış Lipid Bandı	3012±3,17	3009±0,51	3011±3,54	3012±3,06	0,05* 0,385** 0,032***
Lipid CH_3 As. Bandı	2927±6,23	2923±0,40	2928±7,42	2927±5,43	0,253* 0,662** 0,272***
Lipid CH_2As. Bandı	2962±4,28	2958±0,00	2962±4,57	2962±4,41	0,037* 0,181** 0,060***
Lipid CH_3Sim. Bandı	2876±2,46	2874±0,00	2876±2,58	2876±2,58	0,085* 0,181** 0,181***
Lipid CH_2Sim. Bandı	2857±4,07	2853±0,00	2857±4,637	2857±3,88	0,126* 0,333** 0,181***
Ester Bandı	1744±0,90	1744±0,51	1744±0,81	1745±0,83	0,591* 0,272** >0,999
Amid-1 Bandı	1635±3,68	1636±3,67	1636±4,16	1635±3,39	0,409* 0,718** 0,337***

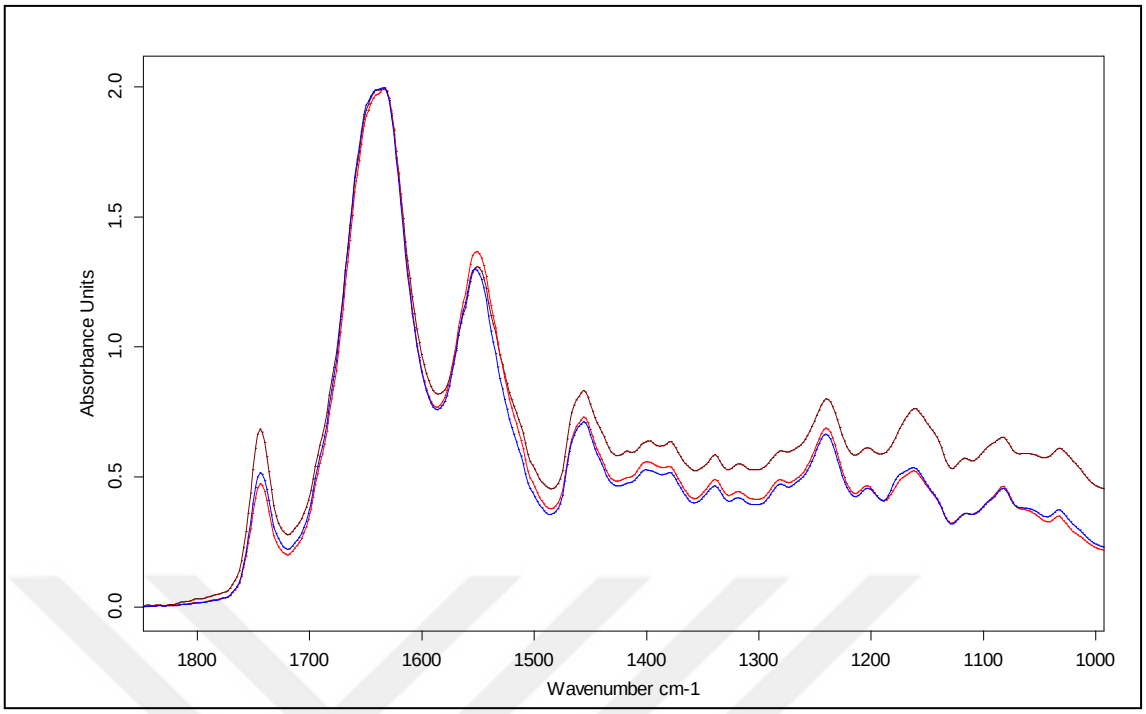
Amid-2 Bandı	1552±2,31	1551±3,12	1552±2,25	1552±2,51	0,722* 0,649** 0,922***
Lipid Bandı	1163±4,04	1161±1,09	1165±5,64	1162±0,63	0,02* 0,07** 0,136***

Hasta Delesyon(↑): Delesyon oranı %82'den yüksek

Hasta Delesyon(↓): Delesyon oranı %16'dan düşük



Şekil 4.11 : Amid A normalizasyonuna göre C-H gerilme bölgesi (3030-2800 cm-1). *Bu bölge lipid bant bölgesi olup, lipid bölgesinde delesyonu yüksek, delesyonu düşük hasta ve kontrol grubu lipid bantları arasındaki farklılıklar gösterilmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasındaki bant kaymaları (p=0,037 Tablo 4.9) Lipid yapısal ve fonksiyonel farklılaşmalarının göstergesidir. (Siyah band-Kontrol, Kırmızı band- Delesyon düşük, Mavi band- delesyon yüksek)*



Şekil 4.12: Amid 1 normalizasyonuna göre 1850-1000 cm-1 bölgesi. *Bu bölge protein bantlarının olduğu bölge olup, protein batlarında yüksek kayma oranları gözlenmemesine rağmen yine bir lipid bandı olan 1160 bandında iki grup arasında anlamlı oranda bir bant kayması tespit edilmiştir.(p=0,02) (Siyah band-Kontrol, Kırmızı band- Delesyon düşük, Mavi band- delesyon yüksek)*

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, obez hastalarda kantitatif PZR kullanarak mtDNA 4977 delesyon taraması yapılmış, ölçülen laktat ve ATP seviyeleri ile bağlantısı incelenmiştir. Aynı zamanda lipid, protein yapı ve fonksiyonel değişiklikleri de tespit edilmiştir.

Yapılan literatür taramalarında, daha önce obez hastalarda oksidatif fosforilasyon mekanizması üstüne mtDNA 4977 delesyonun etkisinin incelenmediği belirlenmiştir.

Hodson L. ve arkadaşlarının adipoz doku üstüne yapmış oldukları çalışmada, adipoz doku hipoksisinin dokuyu proinflamatuar bir fenotipe götürerek obeziteye bağlı adipoz doku disfonksiyonunun nedeni olabileceği incelenmiştir. İnsanlarda adipoz doku oksijenazyonu ve hipoksiye duyarlı genlerin ekspresyonu değerlendirilmiş, ancak hipoksinin ara metabolizma üzerinde etkisi araştırılmamıştır. Adipoz dokunun net bir laktat üreticisi olduğu, obezitede adipoz dokuya oksijen dağıtımının azaldığı ($p<0,05$) bununla beraber oksijen tüketiminin de azaldığı gösterilmiştir. Adipoz dokunun glikolitik olduğu fakat hipoksik olmadığı önerisi getirilmiş. Obezite ile ilişkili adipoz doku hipoksisinin potansiyel bir disfonksiyon faktörü olduğunu destekleyen hiçbir metabolik kanıt bulunmamştır. (Hodson 2013, Hoffstendt 2010)

Dünya çapında sanayileşmiş gelişmekte olan ülkelerde mevcut çabalara rağmen obezite ve buna bağlı hastalıkların sıklığı katlanarak artmaktadır. Bu durum özellikle gençlerde endişe vericidir. Güncel tedavi stratejileri muhtemelen kilo kaybına, insan vücudunda doğuştan gelen direnç sebebiyle sınırlı başarı sağlamaktadır. Ancak enerji harcamasını hedefleyen yeni yaklaşımlar ve mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu obezite ile mücadelede yeni tedavilere ışık tutmaktadır (Serra 2013). Mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu yağ asitlerinden elde edilen enerji kaynağıdır. Obezite ve buna bağlı patolojilerde aşırı miktarda lipid bulunduğundan birçok araştırma yağ asidi oksidasyonundaki artış ile bunun nasıl ortadan kaldırılabileceği yönündedir. Serra D. ve ark. obezitede enerji harcanmasındaki artışın karaciğer, kas, beyaz ve kahverengi yağ dokusunu da içeren birçok dokuda faydalı etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. İnsülin direncini düzenlemek yada kilo kaybı için dokularda yağ asidi oksidasyonunun ayarlanması gerekliliği hala araştırma konusudur. (Kershaw 2004)

Blaak E.E. ve ark. yapmış oldukları çalışmada obezite ve Tip 2 diabet gibi insüline dirençli durumların, katekolamin aracılı lipoliz ve iskelet kasında yağ asidi kullanımında

bozukluklarla karakterize olduğunu tanımlanmıştır. Bu bozuklukların artmış yağ dokusu depolanmasının oluşma ve korunmasında önemli rol oynayabileceği söylenmektedir. Dolaşımdaki artmış doymamış yağ asidi konsantrasyonu, lipid ara ürünlerinin birikimi ve iskelet kasındaki triacilgliserol; hepsi insülin direnci ve diyabet gelişimi için risk faktörleridir. Artmış yağ dokusu depoları, bozulmuş insülin aracılı lipoliz inhibisyonu, iskelet kasının belli koşullarda dolaşımdaki artan doymamış yağ asidi konsantrasyonundan yağ asidi alma yeteneğinin azalması insülin direnci ve kardiyovasküler hastalıklar için risk faktörüdür. Ayrıca yağ asidi alımı ve iskelet kasının yağ asidi oksidasyon yeteneği arasındaki dengesizliğin, diaçilgliserol, yağ asidi acil-KOA ve triaçilgliserol gibi lipid ara ürünlerinin birikimini uyardığı yönünde artan kanıtların mevcut olduğu belirtilmiştir ki bu da iskelet kası insülin direnciyle kuvvetli ilişkilidir (Blaak 2003).

İnsan mitokondriyal DNA'sı (mtDNA) 16,569 bç ile ifade edilen çift sarmallı dairesel yapıdadır. Bu genin ekspresyonu mitokondriyal solunum fonksiyonu için esastır (Lee 1994). Nüklear DNA çok farklı şekilde mtDNA intronlar olmadan çıplak kompakt bir DNA yapısına sahiptir. Bu karakteristik özellik mtDNA'yı reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikal saldırılarına karşı daha savunmasız hale getirmektedir. (Ames 1989) Son birkaç yılda birtakım mtDNA nokta mutasyonları ve delesyonlarının spesifik hastalıklarla ilişkisi belirlenmiştir. Yaşlı hastaların farklı dokularında daha fazla ve farklı boyutta mtDNA delesyonları tanımlanmıştır. En yaygın olanı mtDNA 4977 delesyonudur. Lee C. ve ark. PZR yönteminin mtDNA delesyonlarının oranını ölçmek için güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. PZR yöntemini kullanarak yapmış oldukları çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular, mtDNA delesyon birikimlerinin doku hücrelerindeki yaşlanma süreci ve doku bozulmasında katkıda bulunan önemli bir faktör olduğu yönündedir. Zhang Y. ve ark. yapmış olduğu çalışmada mt DNA 4977 kopya sayısının ve mtDNA 4977'nin toplam mtDNA 'ya oranının yaş ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Özellikle mitokondriyal hastalığa sahip kişilerde toplam mtDNA kopya sayısı azalmışken, yaşla birlikte sağlıklı kişilerde toplam mt DNA kopya sayısında artış saptanmıştır. Laktik asidoz mitokondriyal hastalıklar arasında oldukça sık rastlanan bir bozukluk olup, Zhang ve ark. çalışmalarında mitokondriyal hastalığa sahip hastalarında %30'unda laktik asidozis bulgusuna rastlamışlardır. Bu da 4977 delesyonunun laktat üretim yolu üzerine etkisini göstermektedir. (Li 2006)

Mitokondriyal DNA mutasyon ve delesyonları nöromüsküler dejenerasyonla karakterize insan hastalıklarına öncülük etmektedir. Porteous W. ve ark. çalışmalarında ATP/ADP oranı, ATP sentez hızı ve mitokondriyal membran potansiyeli üzerine mtDNA 4977 delesyonunun etkisini araştırmışlardır. Oksidatif fosforilasyon üzerinde önemli bir kontrolü olan bir solunum sistemi kompleksindeki nispeten küçük bir kusur, hücre için önemli biyoenerjetik sonuçlara sebep olabilmektedir. MtDNA 4977 delesyon birikimi mitokondriyal protein sentezini ve mitokondriyal solunum enzimi kompleksinin akativitesini azaltmaktadır. Bu solunum enzim kompleks aktivitesindeki azalma mitokondriyal ATP sentezinde bir azalmaya ve sağlam hücrelerin ATP/ADP oranında bir düşüşe neden olmaktadır. Azalan mitokondriyal membran potansiyelinin sitoplazmik kalsiyum homeostazını bozması ve ATP sentezini etkilemesi beklenmektedir.

Ahmadi M. ve ark. yapmış oldukları çalışmada mutasyon ve yaşlanma sürecinin birbirini güçlendiren etkenler olduğunu varsayıp, mtDNA 4977 delesyonunun yaşla birlikte arttığı hipotezini araştırmışlardır.Yaşla birlikte mtDNA 4977 delesyon artışının beyin, kalp, kas, göz gibi bölünmeyen post mitotik dokularda gözlendiği belirtilmiştir. Her ne kadar bazı çalışmalarda yaşın delesyon oluşumunu arttıran bir faktör olduğu belirtilse de yaşam tarzı, sigara kullanımı, beslenme alışkanlıkları gibi faktörlerin mtDNA üstündeki zararlı yada faydalı etkileri ön plana çıkarılmıştır.

Obezite ile ilişkili organa özgü meydana gelen patolojik durumlar kas, karaciğer ve yağ dokusu fonksiyonlarının düzensizliğinden kaynaklanabilir. Bununla birlikte bu organlardaki yapısal farklılıkların alt nedeni uzun yıllardır araştırılmaktadır. Doğan A. ve ark. yaptığı çalışmada ATR-FTIR spektroskopisi ile adipoz doku, karaciğer ve kas dokusundaki genetik farklılaşmalar analiz edilmiştir. (Doğan 2013) Çalışmada obez hastalarda dokuya özgü makromolekül değişimleri incelenmiş, incelenen gruplardaki titreşim modları değerlendirilip kimyasal bileşim ve yapısal değişiklikler saptanmıştır. Yine Baloğlu ve ark. yapmış olduğu çalışmada, visseral ve subkutan adipoz dokular makromoleküler içerik açısından karakterize edilmiş, gerekli karşılaştırmalar ile beyaz ve kahverengi adipositler arasındaki geçiş incelenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, obez gruplarda kahverengi adipositlerin beyaz adipositlere geçişinin ortaya çıkmasına bağlı olarak oluşan UCP I protein içeriğinin azalması ile birlikte lipid/protein oranında belirgin bir artış olduğu gösterilmiştir. Adipositler lipid depoları olup, enerji ihtiyacını karşılamak amacıyla da kullanılmaktadırlar. Adipoz dokunun membran lipidleri ve lipid

metabolizmasındaki değişiklikler protein metabolizmasını da etkilemektedir. Azalmış protein miktarı Amid-1 bandı değeri ve Amid-1/Amid-2 bandı oranı hesaplanarak belirlenmiş ve obezlerde protein ekspresyonundaki değişiklikler saptanmıştır. Yine lipid metabolizmasındaki değişklikler lipid/protein oranı, oleofinik/prot., CH2/CH3 asm. Oranlamaları yapılarak saptanmıştır. Kahverengi yağ dokusunun yağ asidi ve glukoz homeostazisi üzerine güçlü bir etkisi olduğu belirtilmiştir. Kahverengi adipoz doku miktarı azaldığında daha düşük doymamışlık/doymuşluk oranı, kalitatif olarak daha uzun hidrokarbon asil zincir uzunluğu ve trigliserid miktar artışı tespit edilen parametreler olarak görülmüştür.

Bozkurt ve ark. yapmış oldukları çalışmada yapı-fonksiyon ilişkisinde lipid düzeni/bozukluğu, lipid akışkanlığı, protein ve lipid dağılımı, doymamış/doymuş lipid miktarı gibi bazı fizyolojik özelliklerden sorumlu olan temel faktörler olarak makromoleküler özelliklerin etkili olduğunu vurgulamışlardır. Lipd ve protein miktar ve yapısındaki değişikliklerin dolaylı olarak membran işleyişi ve iyon kanal kinetiği ile kuvvetli şekilde ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bozkurt ve ark. çalışmalarında Tip I Diabette SOL(soleus) kasına kıyasla EDL(extensor digitorum longus) kasında makromoleküllerde ortaya çıkan kompozisyonel, yapısal ve fonksiyonel değişiklikleri belirlemek için FTIR spektroskopisini kullanmışlardır. Protein yapısında diabete bağlı değişiklikleri belirlemek için ikincil protein yapı analizine özel olarak dikkat edilmiştir. FTIR spektrumunda absorpsiyon bantlarının yoğunluğu ilgili fonksiyonel grupların konsantrasyonlarını belirlemek için kullanılmıştır.

Yağ dokusunda fazla trigliserid birikimi obezitenin ana nedenidir ve dolaşım sistemine aşırı yağ asidi salınımına sebep olur. Bu durum obezite ve insülin direnci ile sonuçlanan birtakım metabolik rahatsızlıklara neden olur. BKİ ve bel çevresi obezite ve obeziteye bağlı metabolik hastalıklar için kesin bir ölçü değildir. Baloğlu ve ark. 2017 yılında yapmış oldukları çalışmalarında visseral yağ dokusunda daha hassas obezite biyomarkerı olarak 1770-1720cm̄¹ bölgesinde bulunan trigliserid bantları için FTIR tanı potansiyelini kullanmayı önermişlerdir. Örneklerin ayırt edilmesinde tanısal araç olarak trigliserid spektralarına hiyerarşik küme analizi (HCA) ile birleştirilmiş FTIR spektroskopisi ve ana bileşen analizi (PCA) uygulamışlardır. Obezite, obeziteye bağlı insülin dirençli ve kontrol gruplarında yüksek duyarlılık ve özgüllükte başarılı ayırt etme elde edilmiştir. Sonuçlar abdominal obezite temelli spektral farklılıkların iç tanısında

trigliserid bölgesinde spektral işaretleyici (marker) olarak kullanılabilen kemometrik yaklaşımlarla birleştiğinde FTIR spektroskopisinin gücünü ortaya çıkartmıştır.

Adipositlerde lipogenez, lipoliz ve farklılaşma için uygun mitokondriyal fonksiyon gerekli olup, bu da adipokinlerin üretilmesi ve sekresyonuyla bağlantılıdır. Bu nedenle beyaz adiposit mitokondriyal fonksiyonunda değişikliklerin glukoz hemoztazı ve tüm vücut enerjisi üzerine ikincil etkilere sahip adiposit fizyolojisinde değişiklikler ile bağlantılı olduğu söylenebilir. Birçok insan çalışmalarında bozulmuş glukoz hemostazı ve dengesiz beyaz adiposit mitokondri görünümü arasındaki bağlantı gösterilmiştir. Schöttl T. ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada çeşitli fare obez modellerinin farklı yağ depolarında mitokondriyal fonksiyonun bir parametresi olan beyaz adiposit OXPHOS seviyeleri ile glukoz toleransı arasındaki bağlantıyı incelenmişlerdir. Glukoz intoleransının beyaz adipositlerde OXPHOS bozulmasından bağımsız olarak oluştuğu ve obezitede bozulmuş glukoz hemostazı için bir tetikleyici olduğu söylenebilir. Beyaz adipositlerde solunum kapasitesinin bozulması sadece sistemik glukoz intoleransının gelişimi için yeterli değildir. Çalışmamızda diyebet parametresi baz alınarak yapılan hasta ve kontrol grubu ATP parametreleri karşılaştırıldığında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir.

Çalışmamızda vücut kitle endeksi 35'in üstünde morbid ameliyatı olan obezite tanısı konmuş hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunun doku örnekleri toplanmış. Dokuda mt DNA 4977 delesyon taraması yapılıp, aynı doku örnelerinin ATP ve laktat seviyelerinin ölçümü yapılmıştır. Tüm veriler arası bağlantı değerlendirildiğinde, hasta ve kontrol grubunun laktat seviyeleri arasında anlamlı fark bulunmuştur. Bu da çalışmamızın başında amaçladığımız obezitede yetersiz oksijenasyonun bir sonucu olarak laktat miktarının artışı beklentisini desteklemektedir. Yine diyabeti olmayan hasta grubunda delesyon ve laktat seviyeleri arasında korelasyon bulunması, delesyonun mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile enerji döngüsünü farklı bir tarafa çevirdiğini göstermektedir. Hasta ve kontrol grubu arasında ATP seviyeleri açısından belirgin bir fark bulunmayıp, yine delesyon ile bağlantılı bir değişiklik de saptanmamıştır. Obez hasta ve kontrol grubunda lipid ve protein miktar, yapı ve fonksiyon değişiklikleri FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. Obez hastalarda lipid miktarında belirgin bir değişiklik olmamasına rağmen protein miktarını gösteren Amid-1 bandında iki grup arasında anlamlı fark bulunmuştur. ($p=0,003$). Yine FTIR spektroskopisi ile lipid ve protein band

kaymaları da iki grup arasında detaylı incelemiştir. CH2 asimetrik lipid bandı ve doymamış lipid bandında her iki grup arasında kaymalar tespit edilmiştir.(p=0,02)Bu band kaymaları lipid yapı ve foknksiyonunun obezite ile bağlantılı olarak değiştiğini göstermektedir.

Çalışmamızın sonuçlarını yorumlarken aşağıda sıralanmış bazı sınırlayıcı faktörlerin olduğunu dikkate almakta yarar olduğu düşüncesindeyiz;

1- Çalışmamızın bazı sonuçlarında bazı parametrelerde bazı gruplarda standart sapmaların yüksek olması nedeniyle değişkenlik katsayıları yüksek çıkmaktadır. Bununla ilgili bazı karıştırıcı faktörlerin olduğu düşünülmektedir. Bunun nedenini ortaya çıkarmak için daha fazla örnek ile çalışılması faydalı olacaktır.

2- Çalışmamızda yağ dokusunda gruplar arasında ATP miktarlarının farklı bulunmasının nedenini bilemiyoruz. Glikolizisten kaynaklanan bir kompansasyon mekanizmasını anlayabilememiz için farklı parametreleri de incelememiz gerekmektedir.

3- FTIR spektroskopisi ile elde edilen verilerde protein miktarılarındaki farklılaşmalar obezitede inflamasyon parametrelerinde ortaya çıkan değişiklikleri düşündürmektedir. Farklı inflamasyon parametreleri de dahil edilerek lipogenez ve ATP üretimi arasındaki bağlantı detaylı olarak incelenebilir.

Çalışmamızın bazı kısıtlayıcı yönleri olması ile birlikte, sonuçlarımız yağ dokusu hücrelerinin metabolizması üstünde diyabetin bir etkisi olduğunu göstermekle birlikte, mtDNA 4977 delesyonunun görülen değişiklikler ile ilişkili olmadığı saptanmıştır.

KAYNAKLAR

Aleksandrova K., Mozaffarian D. Addressing the perfect storm: Biomarkers in Obesity and Pathophysiology of Cardiometabolic Risk. 2018. 64:1, 142-153

Baloğlu F., Garip Ş., Heise S., Brockmann G., Severcan F. FTIR imaging of structural changes in visceral and subcutaneous adiposity and brown to white adipocyte transdifferentiation. Analyst 2015,140 2205-2214

Baloğlu F., Baloğlu O., Heise S., Brockmann G., Severcan F. Triglyceride dependent differentiation of obesity in adipose tissues by FTIR spectroscopy coupled with chemometrics. Journal of Biophotonics 1-11 (2017)

Barlow, SE. And Dietz W.H Obesity evaluation and treatment: Expert Committee recommendations. The Maternal and Child Health Bureau, Health Resources and Services Administration and the Department of Health and Human Services.Pediatrics, 102 (3), E29

Blaak E. Fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus, (2003), 62, 753-760 Proceeding of the Nutrition Society

Bozkurt Ö., Severcan M., Severcan F. Diabetes induces compositional, structural and functional alterations on rat skeletal soleus muscle revealed by FTIR spectroscopy: a comparative study with EDL muscle. The Royal Society of Chemistry 2010, 135, 3110-3119

Cağın U., Enriquez J.A. Mitochondrial DNA- related disorders: emphasis on mechanism and heterogeneity. Turkish Journal of Biology2015 39:840-855

Chen Y.D, Varasteh B.B, Reaven G.M. Plasma lactate concentration in obesity and type-2 diabetes. Diabete&Metabolism 1993; 19(4): 348-354

Chen T., He J., Shen L., Fang H. The mitochondrial DNA 4,977-bp deletion and its implication in copy number alteration in colorectal cancer. BMC Medical Genetics 2011, 12:8

Chuanzhong, Y. Ming, G., Fanglin, Z., Haijiao, C., Zhen, L., Shiping, C. et al. (2002). Real-time quantitative reverse transcription-PCR assay for renal cell carcinoma-associated antigen G250. *Clin Chim Acta,* 318, 33–40.

DiGirolamo M., Newby F.D, Lovejoy J. Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. FASEB J. 1992 Apr. 6(7):2405-12

Doğan A., Lasch P., Neuschl C., Millrose M., Alberts R. ATR-FTIR spectroscopy reveals genomic loci regulating the tissue response in high fat diet fed BXD recombinant inbred Mouse strains. BMC Genomics 2013, 14:386

Ghouse M., Barwal S., Wattamwar A.S. A review on Obesity. Health Science Journal 2016 Vol. 10 No.4.13

Gorstein J., Grosse R., The Indirect costs of obesity to society. 1994 (1) 58-61

Halberg N., Wernstendt I., Scherer P.E., The Adipocyte as an Endocrine Cell. Endocrinol Metab.Clin North Am. 2009 September 37(3): 753- 768

Hodson L., Humphreys S.M., Karpe F., Frayn K. Metabolic Signatures of Human Adipose Tissue Hypoxia in Obesity. Diabetes 62: 1417-1425, 2013

Hoffstendt J., Arner E., Wahrenberg H., Andersson D.P., Qvisth V. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. Diabetologia (2010) 53: 2496-2503

Hunter C.A., Kartal F., Koç Z.C., Murphy T., Kim J.H., Denvir J., Koç E.C. Mitochondrial oxidative phosphorylation is impaired in TALLYHO mice, a new obesity and type 2 diabetes animal model. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 116 (2019)

Ide T., Tsutsui H., Kang D., Hayashidani S. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. Circulation Research 2001

Kaila B., Raman M. Obesity: A review of pathogenesis and management strategies. Can J Gastroenterol Vol 22 No:1 January 2008

Karimova A., Oltulu Y.M., Azaklı H., Kara M., Ustek D., Tutluoğlu B., Onaran I. Lack of association between increased mitochondrial DNA 4977 deletion and ATP levels of sputum cells from chronic obstructive pulmonary disease patients versus healthy smokers. Mitochondrial DNA 2015

Karpe F., Dickmann J.R., Frayn K.N. Fatty acids, obesity, and Insulin resistance: time for a reevaluation. Diabetes Vol. 60 October 2011

Kayaaltı Z., Cantürk N., Şahiner L. Detection of mitochondrial DNA deletions in heart tissue with acute myocardial infarction. Ankara Ünv. Tıp Fakültesi Mecmuası (2009), 62(1)

Kershaw, E.E and Flier,J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab, 89, 2548-2556

Kim S.H., Chi J.G., Characterization of a Mitochondrial DNA Deletion in Patients with Mitochondrial Myopathy. Mol. Cells Vol.7, No. 6, 726-729

Lee H., Pang C., Hsu H., Wei Y., Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. Biochimica et Biophysica Acta 1226 (1994) 37-43

Li C.T., Li L. and Liu, Y. (2006). Relationship between human age and mtDNA 4977 deletions in human blood cells. Fa Yi Xue Za Zhi., 22(5), 346-8.

Lim, P.S., Ma, Y.S., Cheng, Y.M., Chai, H., Lee, C.F., Chen, T.L. et al. (2002). Mitochondrial DNA Mutations and Oxidative Damage in Skeletal Muscle of Patients with Chronic Uremia. *J Biomed Sci.*, 9, 549–560

Lounsbury E., Zhao F., Lounsbury K.M. Adipose Tissue Hypoxia: Effect on metabolism and insülin sensitivity. Journal of Nutrition & Food Sciences 2016; 6:3

Merwe M.T., Schlaphoff G.P., Crowther N.J. Lactate and Glycerol Release from Adipose Tissue in Lean, Obese and Diabetic Women from South Africa. The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism Vol.86 No:7 3296-3303

Munsela P., Despres J.P, Martinez J.A, Bray G.Obesity. Nature Reviews / Disease Primers 2017 Vol:3

Olszewska M., Growth D., Szczerbinski L. Epidemiology and pathogenesis of obesity. Pos.N.Med. 2018(2): 102-105

Richter C.Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. Int J Biochem Cell Biol 1995; 27:647-53

Passarella, S., Atlante, A. and Valenti, D. (2003). The role of mitochondrial transport in energy metabolism. *Mitochondrion*, 2, 319–343.

Phypers B., Pierce T. Lactate physiology in health and disease. Continuing Education in Anaesthesia Critical Care& Pain Vol.6 no:3 2006 128-132

Pitceathly R.D.S., Rahman S., Hana M.G. Single deletions in mitochondrial DNA-Molecular mechanisms and disease phenotypes in clinical practice. Neuromuscular Disorders 22 (2012) 577-586

Prakash S.Beta (β)- Oxidation of Fatty Acid and its associated Disorders International Journal of Clinical Biochemistry Vol. 5(1) pp. 158-172 December, 2018

Sano T., Ban K., Ichiki T. Kobatashi M. Molecular and Genetics Analyses of two patients with Pearson's Marrow-Pancreas sydrome. Pediatric Research Vol.34, No.1 1993

Schöttl T., Kappler L., Fromme T., Klingenspor M. Limited OXPHOS capacity in White adipocytes is a hallmark of obesity in laboratory mice irrespective of the glucose tolerance status. 4 (2015); 631-642

Schwartz M., Seeley R., Zeltser L. Obesity Pathogenesis: An endocrine society scientific statement. Endocrine Reviews, August 2017, 38 (4): 267-296

Serra D., Mera P., Malandrino M.I, Mir J.F., Herrero L., Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity. Antioxidants & Redox Signaling Vol. 19, Number 3, 2013, 269-284

Sharpe A.J., McKenzie M. Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Disorders Associated with Short-Chain Enoyl- CoA Hydratase (ECHS1) Deficiency. Cells 2018, 7, 46

Shenkar R., Navidi W., Tavare S., Dang M., Chomyn A. The Mutation Rate of the Human mtDNA Deletion mtDNA 4977. Am. J. Hum. Genet. 59: 772-780, 1996

Takamura T., Misu H., Matsuzawa-Nagata N., Sakurai M., Ota T.Obesity upregulates genes involved in oxidative phosphorylation in livers of diabetic patients. Obesity Vol.16 N: 12 December 2008

Tuppen H.A.L., Blakely E.L., Turnbull D.M., Taylor R.W., Mitochondrial DNA mutations and human disease. Biochimica et Biophysica Acta 1797 (2010) 113-128

Vernochet C., Mourier A., Bezy O., Macotela Y. Adipose-spesific deletion of TFAM Increases Mitochondrial Oxidation and Protects Mice against Obesity and Insulin Resistance. Cell Metab. 2012 Dec.5 ; 16(6): 765-776

Wakil S.J., Elheiga L. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. Journal of Lipid Research April. 2009

Wallace DC, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Voljavec AS, Shoffner JM. Mitochondrial DNA mutations associated with neuromuscular disseases: analysis and diagnosis using the polymerase chain reaction. Pediatr Res 1990; 28 (5): 525-8.

Ye Jianping. Hypoxia in obesity- from bench to bedside. Journal of Translational Medicine 2012, 10

Yusoff A., Abdullah W., Khair S., Radzak S., A comprehensive overview of mitochondrial DNA 4977-bp deletion in cancer studies. Oncology Review 2019; vol 13: 409

Zeviani M., Antozzi C. Mitochondrial disorders.European Society for Human Reproduction and Embryology. 1997, Vol.3 no.2 133-148

Zhang Y., Ma Y., Zhang Y., Liu H. Zhu S. Deletion of a 4977-bp fragment in the mitochondrial genome is associated with mitochondrial disease severity. 2015

Zheng Y., Luo X., Zhu J. Mitochondrial DNA 4977 bp deletion is a common phenomenon in hair and increases with age. Bosn. J Basic Med. Sci 2012; 12(3): 188-192

HAM VERİLER

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu çalışma için sizden ameliyatınız sırasında cerrahınız tarafından alınacak olan dokudan 1cm³ parça kullanılacaktır. Alınacak olan bu doku laboratuarımızda çalışılacaktır.

Kabul etmeniz halinde katılacağınız bu çalışma bir doktora araştırmasıdır. Araştırmanın amacı hastalığınızın gelişimi üzerine etkisi olduğu düşünülen genlerdeki değişikliklerin incelenmesi ve hastalığınızın seyri üstüne etkisini tespit etmektir. Araştırmaya katılacak tahmini gönüllü sayısı 80'dir. Gönüllü olarak sizin araştırma üzerinde herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır. Araştırma boyunca sizden maddi bir katkı talebi olmayacaktır. Size de herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Bağlı bulunduğunuz Sosyal Güvenlik Kurumu (SGK)'dan da herhangi bir ücret alınmayacaktır. Sizin için herhangi bir rahatsızlık veya risk oluşturmayacak bu çalışma, kısa dönemde size bir fayda da sağlamayacaktır. Ancak uzun dönemde hastalığın gelişiminin daha iyi anlaşılabilmesini ve alternatif tedavi geliştirebilmek için çalışma önemlidir.

Araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlı olup araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz. Reddetmeniz halinde yararınıza engel yada cezai bir durum ortaya çıkmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar size ait tıbbi bilgilere ulaşılabilecek ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.

Siz veya yasal temsilciniz bilgilendirilmiş olur formunu imzalamakla bunu kabul etmiş olacaksınız. Ayrıca kimliğinizi ortaya koyacak kayıtlar da gizli tutulacaktır.

Araştırma esnasında sizi ilgilendirecek bir bilgi söz konusu olduğunda siz veya yasal temsilcinize derhal haber verilecektir.

Araştırma hakkında ek bilgiye 530 4268922'den ulaşabilirsiniz.

Hasta Olur Formundaki tüm açıklamaları okudurm, dinledim, anladım, istediğim soruları sordum ve cevapları aldım. Bu klinik araştırmaya gönüllü olarak hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

‘ Obezitede adipozit mitokondri fonksiyonu ve Laktat seviyesi üzerine mtDNA 4977 delesyonunun etkisinin araştırılması ‘ araştırması kapsamında alınan doku örneklerimin;

☐ Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.

☐ İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Hasta/ hasta yakını adı, soyadı İmzası Tarih
Telefon:
Adres:

Hasta/ hasta yakını adı, soyadı İmzası Tarih

Telefon:

Adres:

Hasta/ hasta yakını adı, soyadı İmzası Tarih

Telefon:

Adres:

ETİK KURUL KARARI

İÜC Tarih ve Sayı: 10/11/2017-422872

BEACA0U6R

T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Doktora Öğrencisi Ayda TEZOL'un etik kurul kararı H-03

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :11.10.2017 tarihli, 380515 sayılı yazı

Anabilim Dalınız Öğretim üyesi **Prof.Dr.Turgut ULUTİN'in** danışmanlığında **Doktora Öğrencisi Ayda TEZOL'un** yürütücülüğünde **Uzm.Dr.Yalçın HACIOĞLU, Uzm.Dr.Mutlu NİYAZOĞLU, Prof.Dr.İlhan ONARAN ve Doç.Dr.Feyzullah ERSÖZ'ün** yardımcılıklarında **"Obezitede Adipozit Mitokondri Fonksiyonu ve Laktat Seviyesi Üzerine mt DNA 4977 Delesyonunun Etkisinin Araştırılması"** başlıklı Doktora Tezi **(Araştırma Fonu)**'nde **(İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi çalışmadan çıkarılmış olup yerine Fakültemiz Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr. Mustafa TAŞKIN'nın çalışmaya yardımcı araştırmacı olarak katılması)** hakkında ilgi yazınız ve ekleri **07 Kasım 2017** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; etik açıdan bulunmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK
Başkan V.

e-İmzalı
Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN
Bölüm Başkanı

Doğrulamak İçin:http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BEACA0U6R

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300
İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 21107- 21108 Faks : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

OBEZİTEDE ADİPOZİT MİTOKONDRİ FONKSİYONU VE LAKTAT SEVİYESİ ÜZERİNE MTDNA 4977 DELESYONUNUN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%10	%7	%2	%7
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	www.temd.org.tr İnternet Kaynağı	%2
2	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	%1
3	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
4	www.powershow.com İnternet Kaynağı	%1
5	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
6	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Istanbul Medipol Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayda	**Soyadı**	TEZOL YILMAZ
Doğ.Yeri	Hollanda/Rotterdam	**Doğ.Tar.**	22/06/1979
Uyruğu	TC	**TC Kim No**	30733862248
Email	aydatezol@gmail.com	**Tel**	5304268922

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ABD	2003
Lisans	İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyolojik Bilimler	2000
Lise	Bakırköy Sabri Çalışkan Lisesi	1996

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Grup Ürün Müdürü	Kurtsan İlaçları	2010-
2.	Ürün Müdürü	İnanır Grup	2007-2010
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	Orta	İyi		

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):