



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SOĞUK STRES UYGULANAN SIÇANLARDA, BEYAZ VE
KAHVERENGİ YAĞ DOKUSUNDA VAZOAKTİF İNTESTİNAL
PEPTİT (VIP) VE RESEPTÖRLERİNİN (VPAC-1 VE
VPAC-2) GEN VE PROTEİN EKSPRESYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHAR DEMİRBAŞ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. ORHAN TANSEL KORKMAZ**

2017



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SOĞUK STRES UYGULANAN SIÇANLARDA, BEYAZ VE
KAHVERENGİ YAĞ DOKUSUNDA VAZOAKTİF İNTESTİNAL
PEPTİT (VIP) VE RESEPTÖRLERİNİN (VPAC-1 VE
VPAC-2) GEN VE PROTEİN EKSPRESYONU**

**TEZ TİPİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

BAHAR DEMİRBAŞ

**DANIŞMAN
Doç. Dr. ORHAN TANSEL KORKMAZ**

Proje No: 201611D24

KABUL VE ONAY SAYFASI

Bahar DEMİRBAŞ'ın Yüksek Tezi olarak hazırladığı "Soğuk Stres Uygulanan Sıçanlarda, Beyaz ve Kahverengi Yağ Dokusunda Vazoaktif İntestinal Peptit (VIP) Ve Reseptörlerinin (VPAC-1 Ve VPAC-2) Ekspresyonu" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

Üye : Doç. Dr. Orhan Tansel KORKMAZ (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Kubilay UZUNER

Üye : Prof. Dr. Yasemin AYDIN

Üye : Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Üye : Yrd. Doç. Gökhan KUŞ

15.05.2017

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08/09/2017 tarih ve 1138/5529 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Yeysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Adipositlerden oluşan yağ dokusu, hücre sayısı ve büyüklüğü bakımından yaşam boyu enerji tüketimine bağlı olarak sürekli hacim değişkenliği gösteren bir dokudur. Organizmanın önemli yaşam ihtiyaçları olarak kabul edilen termojenez, immün ve metabolizma yanıtı, laktasyon gibi olaylara katılarak fonksiyon gösterir. Yağ dokusu yapısal özelliklerine göre 3 tipe ayrılmaktadır: beyaz yağ dokusu (BYD), kahverengi yağ dokusu (KYD) ve bej yağ dokusudur. Vazoaktif intestinal peptit (VİP), merkezi ve periferik sistemde yaygın dağılıma ve geniş fizyolojik etkilere sahiptir. Günümüzde VİP'in tanımlanan iki reseptörü bulunmaktadır: bunlar VPAC-1 ve VPAC-2'dir.

VİP ve reseptörlerinin, soğuk stresin yağ dokusu üzerindeki etkileri ile ilişkilendirilmiş çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bizim bu çalışmadaki amacımız: epididimal yağ dokusunda varlığı gösterilmiş ancak kahverengi yağ dokusunda ve adipositlerde varlığı gösterilmemiş olan ayrıca soğuk stres gibi koşullarda nasıl etkilendiği bilinmeyen VİP ve reseptörlerinin ekspresyonunu ve protein ifadelerini araştırmaktır.

Elde ettiğimiz bulgulara göre, kontrol gruplarında VİP ve VPAC-1 gen ekspresyonu gözlenmiştir, VPAC-2 gen ekspresyonu saptanmamıştır. Soğuk stres, BYD ve KYD'de VİP'in gen ekspresyonunda artışa sebep olurken, VPAC-1'in BYD'de ekspresyonunun azalmasına neden olmuştur, KYD'de ise VPAC-1'in ekspresyonunun artışı sağlamıştır. Ayrıca, kontrol gruplarında VPAC-2'nin gen ekspresyonu olmamasına rağmen soğuk stres ile birlikte hem BYD'de hemde KYD'de VPAC-2 gen ekspresyonu tespit edilmiştir. VİP, VPAC-1 ve VPAC-2 genlerinin protein ifadelerinin tespit çalışmalarında ise: BYD ve KYD adipositlerinde sadece VPAC-1 gen ekspresyonu olmasına rağmen VİP, VPAC-1 ve VPAC-2 protein ifadeleri tespit edilmiştir. Soğuk stres ile birlikte BYD ve KYD adipositlerinde VİP, VPAC-1 ve VPAC-2 protein seviyeleri artmıştır.

Anahtar Kelimeler: Vazoaktif intestinal peptit (VİP), VPAC-1, VPAC-2, yağ dokusu, soğuk stres.

SUMMARY

Fat tissue composed of adipocytes, cells in terms of the number and size depending on the lifetime energy consumption is showing a constant volume of tissue variability. Adipose tissue is divided into three types according to structural features that white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT) and beige adipocytes. Vasoactive intestinal peptides (VIP) has central and peripheral distribution and wide physiological effects. VIP has structurally related two receptors: VPAC-1 and VPAC-2.

VIP-adipose tissue associated studies are limited. In this study, we aim to investigate of VIP and VIP receptors distributions with normal and cold stress induced conditions in brown and white adipose tissues of rats.

According to the results, VIP and VPAC-1 but not VPAC-2 gene expressions were found in the whole BAT and WAT of control groups. Cold exposure up regulated VIP gene in WAT and BAT. Cold exposure induced VPAC-2 gene expression in both WAT and BAT. As for the VPAC-1 gene expression, it was increased in BAT but slightly decreased in WAT after the cold exposure. For pure adipocytes: there was only VPAC-1 gene expression for brown and white adipocytes for controls. After the cold pressure, while VPAC-1 gene expression decreased in the BAT and WAT adipocytes, cold expose downregulated their VPAC-1 gene expressions. Protein detection studies on white and brown adipocytes have identified VIP, VPAC-1 and VPAC-2 proteins, although only VPAC-1 expression is present in both white and brown adipocytes. After cold pressure, protein amounts of VIP, VPAC-1 and VPAC-2 proteins increased.

Key words: Vasoactive intestinal peptide (VIP), VPAC-1, VPAC-1, adipose tissue, cold stress.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
SUMMARY.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLO DİZİNİ.....	viii
ŞEKİL DİZİNİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Yağ Dokusu.....	3
2.1.1. Yağ Dokusu Tipleri, Vücutta Yerleşimleri ve Özellikleri...5	
2.1.1.1. Beyaz Yağ Dokusu.....	6
2.1.1.1.1. Beyaz yağ dokusunun dağılımı.....	6
2.1.1.1.2. Beyaz yağ dokusunda enerji üretimi.....	7
2.1.1.2. Kahverengi Yağ Dokusu.....	9
2.1.1.2.1. Kahverengi yağ dokusunda enerji üretimi.....	10
2.1.1.3. Bej Yağ Dokusu.....	12
2.2. Vazoaktif İntestinal Peptit (VİP).....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	19
3.1. Kullanılan Materyaller.....	19
3.1.1. Kullanılan cihazlar.....	19
3.1.2. Kullanılan materyaller.....	19
3.1.2.1. Adiposit izolasyon materyalleri.....	19
3.1.2.2. RT-PCR materyalleri.....	19
3.1.2.3. Western- Blot materyalleri.....	20
3.2. Deney Hayvanları.....	20
3.3. Soğuk Stres Uygulaması.....	21
3.4. Adipositlerin İzolasyonu.....	21
3.5. Reel-Time PCR Tekniği ile VİP ve reseptörleri olan VPAC-1 ve VPAC-2'nin mRNA Ekspresyonu.....	23
3.5.1. Dokulardan total RNA izolasyonu.....	23
3.5.2. Elde edilen total mRNA'lardan cDNA sentezi.....	23
3.5.3. Reel-Time PCR protokolü.....	24
3.6. Western- Blot ile VİP ve reseptörleri olan VPAC-1 ve VPAC-2'nin Protein Miktar Tayini.....	24
3.6.1. Toplam protein izolasyonu.....	25
3.6.2. Protein miktar tayini.....	25
3.6.3. Proteinlerin jele yüklenmesi için hazırlanması.....	25
3.6.4. Jel elektroforezi (running).....	26
3.6.5. Membrana transfer ve blotlama.....	26
3.6.6. Bloklama.....	26
3.6.7. Görüntüleme.....	27
3.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	27
4. SONUÇLAR.....	28
4.1. VİP ve reseptörleri olan VPAC-1 ve VPAC-2'nin mRNA Ekspresyon Sonuçları.....	28

4.1.1. Tüm yağ dokusunda VIP mRNA ekspresyonu.....	29
4.1.2. Tüm yağ dokusunda VPAC-1 ekspresyonu.....	31
4.1.3. Tüm yağ dokusunda VPAC-2 ekspresyonu.....	33
4.1.4. Adipositlerden VPAC-1 ekspresyonu.....	35
4.2. Western-Blot Sonuçları.....	37
4.2.1. Adipositlerde VIP protein miktarı tayini.....	37
4.2.2. Adipositlerde VPAC-1 protein miktarı tayini.....	39
4.2.3. Adipositlerde VPAC-2 protein miktarı tayini.....	41
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
7. KAYNAKLAR.....	48
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	58



TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1: YD'den salınan önemli adipokinler ve özellikleri.....	4
Tablo 2.2: VİP'in farklı sistemlerdeki fizyolojik etkileri.....	16
Tablo 3.1: Deney grupları.....	21
Tablo 3.2: Reel- Time PCR içeriği.....	24
Tablo 3.3: 1ml için RIPA buffer karışım içeriği.....	25
Tablo 3.4: 200 µl Qubit protein assay solüsyonu için karışım içeriği.....	25
Tablo 3.5: iBİND solüsyonu için karışım içeriği.....	26
Tablo 4.1: Tüm yağ dokusunda GAPDH ile normalize edilen VİP, VPAC-1 ve VPAC-2 mRNA düzeylerinde kat artış seviyeleri (ortalama±SEM) ve istatistiksel analiz sonuçları.....	28
Tablo 4.2: Saf adipositlerde GAPDH ile normalize edilen VİP, VPAC-1 ve VPAC-2 mRNA düzeylerinde kat artış seviyeleri (ortalama±SEM) ve istatistiksel analiz sonuçları.....	28
Tablo 4.3: Tüm yağ dokusunda VİP mRNA kat artışı.....	30
Tablo 4.4: Tüm yağ dokusunda VPAC-1 mRNA kat artışı.....	32
Tablo 4.5: Tüm yağ dokusunda VPAC-2 mRNA kat artışı.....	34
Tablo 4.6: Saf Adipositlerde VPAC-1 mRNA kat artışı.....	36

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1: Yağ dokusu dağılımı.....	5
Şekil 2.2: Yağ dokusunun hücresel bileşenleri.....	6
Şekil 2.3: Beyaz ve kahverengi yağ dokusunun mikroskopik görüntüsü.....	7
Şekil 2.4: Beyaz adipositlerin kahverengi adipositlere dönüşümünü gerçekleştiren faktörler.....	8
Şekil 2.5: Beyaz ve bej adipositlerin oluşum mekanizması.....	9
Şekil 2.6: Kahverengi yağ adipositleri oluşumunun mekanizması....	10
Şekil 2.7: Kahverengi yağ adiposit mitokondrisinde UCP-1 aracılığı ile ısı üretim mekanizması.....	11
Şekil 2.8: VIP'in moleküler Yapısı.....	13
Şekil 2.9: VIP'in sinyal iletiminin moleküler mekanizması.....	15
Şekil 3.1: Adipositlerin izolasyonu.....	22
Şekil 4.1: Tüm Yağ dokusunda VIP mRNA İfade Profilleri.....	29
Şekil 4.2: Tüm Yağ dokusunda VPAC-1 mRNA İfade Profilleri.....	31
Şekil 4.3: Tüm Yağ dokusunda VPAC-2 mRNA İfade Profilleri.....	33
Şekil 4.4: Saf adipositlerdeki VIPAC-1 mRNA ifade profilleri.....	35
Şekil 4.5: VIP' in western-blot sonuçları.....	38
Şekil 4.6: VPAC-1'in western-blot sonuçları.....	40
Şekil 4.7: VPAC-2'nin western-blot sonuçları.....	42

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

AC	: Adenilat Siklaz
ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
ATP	: Adenozin Mono Fosfat
Bkz	: Bakınız
BYD	: Beyaz Yağ Dokusu
c-AMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
Cl	: Klor
DAD	: Diaçilgliserol
Ebf2	: Helix-loop-helix Transkripsiyon Faktör Proteini
ER	: Endoplazmik Retikulum
GH	: Büyüme Hormonu
GHRH	: Büyüme Hormonu Salıverdirici Hormon
GİP	: Gastrik İnhibitör Peptit
CHO₃	: Bikarbonat
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HSL	: Hormon Duyarlı Lipaz
KYD	: Kahverengi Yağ Dokusu
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
PACAP	: Pitüiter Adenilat Siklaz Aktive Edici Polipeptit
Pgc1-α	: Peroksizom Prolifaretör Aktive Edici Faktör- γ Reseptör Koaktivatör- α
Ppar-γ	: Preksizom Prolifaretör Aktive Edici Reseptör- γ
PRDM16	: Çinko İçeren Farklılaşma Faktörü
PLC	: Fosfolipaz C
PKC	: Protein Kinaz C
PIP₂	: Fosfotidilinositol-4,5-Bifosfat
RT-PCR	: Real-Time PCR
Sirt1	: Sirtuin-1
Ig	: İmmünoglobülin
IP₃	: İnositol-1,4,5-Trifosfat
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LH	: Luteinize Edici Hormon
TZD	: Tiazolidindion
UCP-1	: Uncoupling protein-1
YD	: Yağ Dokusu
VİP	: Vazoaktif İntestinal Peptit
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Bağ dokunun özel bir tipi olan yağ dokusu (adipoz doku, YD) adipositlerden (yağ hücresi) oluşur. YD, çoklu depo organı olarak kabul edilir. Adipositlerden oluşan YD, organizmanın önemli yaşam ihtiyaçları olarak kabul edilen; ısı üretimi (termojenez) ve yalıtımı, immün ve metabolizma yanıtı, laktasyon gibi olaylara katılarak fonksiyon gösterir (Cinti, 2005). Ayrıca, adipositler pasif hücreler değildir, aksine ekstraselüler sıvıya birçok molekül salıvermektedirler. Salıverilen bu moleküllere *adipokinler* denir ve bugün tanımlanabilen adipokinlerin sayısı yüze ulaşmıştır. Adipositlerden salıverilen bu adipokinler diğer hücreler ile endokrin, parakrin ve otokrin yolla haberleşme sağlarlar (Töre, Tunçel, 2007). YD, hücre sayısı ve büyüklüğü bakımından yaşam boyu enerji tüketimine bağlı olarak, sürekli hacim değişkenliği gösteren bir dokudur. YD aktif bir doku olup, nöro-endokrin-immün düzenlemeye doğrudan katılan bir organ olarak görev yapar. Yağ hücreleri enerji depolama ve salıverme süresince bu fonksiyonları için sinir sistemi, endokrin sistem ve immün sistem ile iletişim kurar. Bu iletişim YD'nin türüne ve çevresel faktörlere göre farklılıklar gösterir (Awad, Bradford 2010).

Yağ dokusu yapısal özelliklerine göre 3 tipe ayrılmaktadır:

- 1) Beyaz yağ dokusu (BYD)
- 2) Kahverengi yağ dokusu (KYD)
- 3) Bej yağ dokusu

BYD çeşitli hücre tiplerinden oluşan gevşek bağ dokusudur ve adipositler, preadipositler, makrafojlara, endotel hücreleri, fibroblastlar ve T-hücrelerini de kapsayan çok yönlü hücre bileşiminden oluşur. Bu bileşim, BYD'yi metabolizma ve inflamasyonda çok önemli bir konuma getirir. Vücutta visseral ve subkutan olmak üzere 2 bölümde bulunur. BYD adipositleri stres koşullarında KYD adipositlerine dönüşür ve bu dönüşüm sırasında bej yağ dokusu ara form doku olarak karşımıza çıkar (Cinti, 2005).

KYD hücreleri nukleusu sıkıştırmayan çok sayıda yağ damlacıkları bulundurur. KYD'nin bir diğer karakteristik özelliği sitoplazmalarında çok sayıda ve büyük mitokondrilere sahip olmasıdır ve bu mitokondrilere bulunan uncoupling protein-1 (UCP-1) aracılığı ile adenosin trifosfat (ATP) yerine termojenez için ısı üretmesidir. Soğuğa maruziyet durumunda ise farklı vücut bölümlerinde (özellikle inter-skapular bölgede) BYD adipositleri KYD adipositlerine dönüşür ve vücut ısısının düzenlenmesine yardımcı olurlar (Cinti, 2005). Kemirgenlerde KYD aktivitesinin artışı sıklıkla soğuğa ve artan besin alımına bağlı olarak sempatik sinir sistemi ile düzenlenir (Berry, Stenesen, Zeve, Graff, 2013). Sempatik sinir sisteminin uyarılması ile nöronlardan salıverilen norepinefrin, β -3 adrenoreseptör aracılığı ile yağ dokusunun sahip olduğu mitokondrilere ısı enerjisi üretimini artırır (Shimizu, Mori, 2005).

Vazoaktif intestinal peptit (VİP) ile ilgili ilk bilgi 1970 yılında Said ve Mutt'un akciğer hasarlı hastalardaki sistemik hipotansiyon üzerine yaptıkları çalışmalarda vazodilatör etkisi ile rapor edilmiştir. Ardından yaptıkları çalışma ile domuz ince bağırsağından VİP'i izole edip tanımlamışlardır ve daha sonra VİP'in birçok organ ve dokuda yaygın olarak bulunduğu gösterilmiştir. VİP, sekretin ve glukagon ailesinde olan diğer hormonlar (sekretin, glukagon, büyüme hormonu salıverdirici hormon (GHRH), gastrik inhibitör peptit (GİP) gibi hormonlar) ile yapısal olarak benzerdir ve bu benzerliği nedeni ile VİP, sekretin peptit ailesinin üyesi olarak sınıflandırılmıştır.

VİP, yaygın dağılımına paralel olarak geniş dağılımda fizyolojik etkilere sahiptir ve gelişme, büyüme, kanser, sirkadiyen ritim, sindirim, solunum, üreme ve kardiovasküler sistemlerin işlevleri ile ilgili fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde yer alır (Laburthe vd. 2007). Ayrıca dokuları oksidatif hasar, inflamasyon gibi ciddi toksik etkilere karşı da koruyucu özelliğe sahip; nörotrofik ve nörotransmitter olarak da davranan çok yönlü bir moleküldür (Harmar vd., 1998).

VİP için ilk reseptör sıçan akciğerinden izole edilmiştir ve VPAC-1 olarak adlandırılmıştır. VPAC-1 yaygın olarak MSS'de, karaciğerde, akciğerde, bağırsakta ve T-lenfositlerinde bulunmaktadır. VİP için ikinci reseptör Luts tarafından bulbus olfactoriustan izole edilmiştir ve VPAC-2 olarak adlandırılmıştır. VPAC-2 de yaygın olarak MSS'de, pankreasta, iskelet kasında, kalpte ve böbrekte bulunmaktadır (Laburthe, Couvineau, Tan, 2007).

VİP'in soğuk strese maruz bırakılan sıçanlarda midede ülser gelişimini engellediği, mide dokusunu koruduğu, soğuğa maruziyet sonucunda damarların nörepinefrine verdiği yanıtı arttırdığı gösterilmiştir. Ancak VİP'in yağ dokusu ile ilişkilendirilmiş çalışmaları oldukça sınırlıdır. Bizim bu çalışmadaki amacımız; subkutan beyaz yağ dokusu ve interskapular aralık kahverengi yağ dokusunda ve adiopositlerinde varlığı gösterilmemiş ayrıca soğuk stres gibi koşullarda nasıl etkilendiği bilinmeyen VİP ve reseptörlerini araştırmaktır.

2- GENEL BİLGİLER

2.1- Yağ Dokusu

Yağ dokusu (YD), yağ dokunun özel bir tipi olan ve adipositlerden oluşan, ayrıca hücre sayısı ve büyüklüğü bakımından yaşam boyu enerji tüketimine bağlı olarak sürekli hacim değişkenliği gösteren bir dokudur (Schling, Löffler, 2002). YD aktif bir doku olup, nöro-endokrin-immün düzenlemeye direkt katılan bir yapı olarak görev yapar (Cinti, 2012). Ayrıca YD enerji depolama/üretim süresince bu fonksiyonları için sinir sistemi, endokrin sistem ve immün sistem ile iletişim halindedir (Awad vd. 2010, Cinti, 2005, Dunmore, Brown, 2013).

YD, klasik olarak fazla enerjinin depolandığı, vücuda yalıtım sağlayan ve dolgu özelliği olan bir dokunun ötesinde, bugün birçok organı etkileyen hormonların, büyüme faktörlerinin, matriks proteinlerinin, enzimlerin ve sitokinlerin salgılandığı bir endokrin organ olarak kabul edilir. Bu doku organizmanın önemli yaşam ihtiyaçları olarak kabul edilen; ısı üretimi (termojenez)-yalıtımı, immün ve metabolizma yanıtları, laktasyon gibi olaylara katılarak fonksiyon gösterir (Awad vd. 2010, Cinti, 2005, David vd., 1981).

YD gelişmiş damar ağına sahiptir ve çoğu bölgesel viseral veya paryetal vasküler sinir-damar demetleri vasıtası ile beslenmektedir. Bu damarlanma aracılığı ile YD, sinir sistemi ile etkileşime girip fizyolojik ve çevresel faktörlere yanıt verebilecek şekilde bağlantılıdır. YD'de kan damarları ile birlikte adipositlerle direkt temas halinde bulunan çok sayıda noradrenerjik lifler (parankimal sinirler) bulunur. Bu bağlantı, YD'nin türleri olan beyaz yağ dokusunda (BYD) ve kahverengi yağ dokusunda (KYD) farklılıklar gösterir. Noradrenerjik liflerin yoğunluğu; soğuğa maruziyet sırasında KYD'de (De Matteis, Ricquier, Cinti, 1998), açlıkta ise BYD'de (Giordano, Frontini, Murano, 2005) artış gösterir.

Adipositlerde enerji trigliseritler olarak depolanır ve trigliseritler adipositlerin büyük bir kısmını kaplar; geri kalan kısmını da diğer hücre organelleri oluşturur (Caro, Sinha, Kolaczynski, Zhang, Considine, 1996). Adipositler, kendi aralarında damar endotel ve düz kas hücreleri ile de sürekli iletişim halindedir (Schling vd. 2002). Adipositler pasif hücre türü değildir, aksine ekstraselüler sıvıya birçok molekül salıvermektedirler. Adipositlerden salıverilen bu salgı ürünlerine *adipokinler* denir ve son zamanlarda yapılan çalışmalar ile tanımlanabilen adipokinlerin sayısı 100'e ulaşmıştır (Tablo 2.1). Adipositlerden salıverilen adipokinler, diğer hücreler ile endokrin, parakrin ve otokrin yolla haberleşme sağlarlar (Töre vd. 2007). Bu faktörler, adiposit farklılaşmasında, vücut yağ kütlesinin düzenlenmesinde, karbonhidrat-lipit ve kolesterol metabolizmasında, kan akışının düzenlenmesinde ve bağışıklık sistemi fonksiyonlarında etki gösterirler (Sylvia, Dorothy, Gary, 2010). Adipositler bu fonksiyonlarını

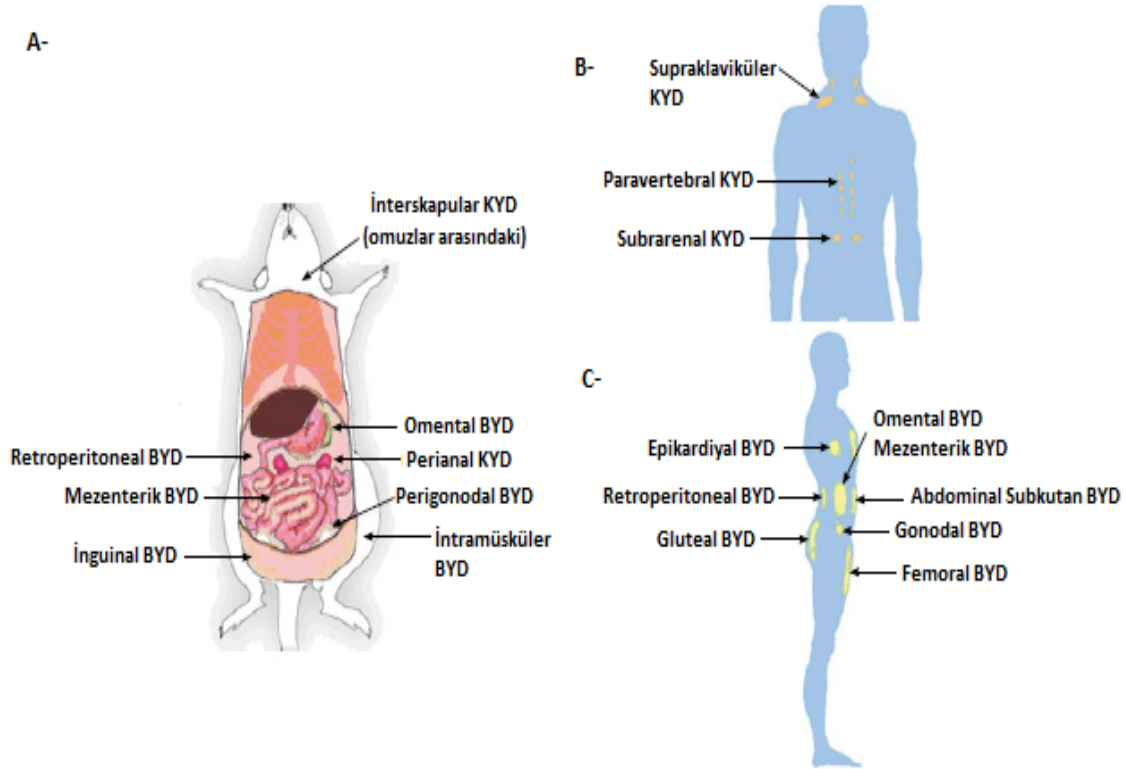
yapısında bulunan hormon ve sitokinlere ait reseptörler aracılığı ile gerçekleştirirler. Adipositlerin membranında bulunan reseptörler: hormon sitokin reseptörleri (leptin, insülin, TSH, anjiyotensin II), adrenerjik reseptörler (β_1 , β_2 ve β_3 , α_1 ve α_2 reseptör) ve lipoprotein reseptörleri (çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) reseptörleri) olarak sınıflandırılabilir. Bu reseptörlerin uyarılması ile oluşan sinyaller hücre fonksiyonlarını stimüle veya inhibe ederek etki gösterirler (Fantuzzi, Mazzone, 2007, Ibrahim, 2010). Lipid ve glikoz homeostazının düzenlenmesinde anahtar rol oynayan adipokinler hemotopoez, üreme ve beslenme davranışları gibi fizyolojik süreçlerde görev alır ve kanser gelişiminin de dahil olduğu, artmış yağ kütlesi ve obezite ile ilgili patolojilerin oluşması ile de etkilerini gösterirler (Villarroya, Cereijo, Villarroya, 2013).

Tablo 2.1: YD'den salınan önemli adipokinler ve özellikleri (Töre vd., 2007).

ADİPOKİN	ÖZELLİKLERİ
Adipsin	YD'de lipid metabolizması üzerine etkilidir, glikoz taşınımını, trigliserid sentezini artırır, lipoliz ve serbest yağ asidi oluşumunu azaltır. Pankreasta insülin sekresyonunu artırır. Karaciğerde trigliserid sentezini artırır, lipolizi düşürür.
Adiponektin	Anti-inflamatuar, anti-aterojenik, anti-diabetik, anti-fibrotik etkileri bulunur.
Leptin	Glikoz ve insülin metabolizmasını, lipolizi, immun ve enflamatuar yanıtları, hematopoezisi ve anjiogenezi düzenler.
Resistin	Glikoz metabolizması, adipogenesis ve enflamasyon üzerinde etkileri vardır.
Visfatin	Anti-apoptatik, proliferasyon, inflamasyon üzerinde etkileri vardır. İnsülin gibi görev yapar.
TNF-α	Adipositlerde enerji metabolizmasını, glikoz homeostazının, lipid metabolizmasını düzenler.
İnterlökin-6	Perifer ve merkezi sinir sisteminde enerji homeostasisi üzerinde etki eder.
Apelin	İnsülin direncini düzenler, termojenezi artırır, BYD kütlesini azaltır.
Hepsidin	Demir homeostasisini düzenler.
Omentin	Obezitede insülin direnci üzerine etkilidir.
Vaspin	Leptin ve resistin seviyelerini azaltır.
Anjiopietin	Lipid metabolizması ve depolanması üzerine etkileri bulunur.

2.1.1- Yağ Dokusu Tipleri, Vücutta Yerleşimleri ve Özellikleri

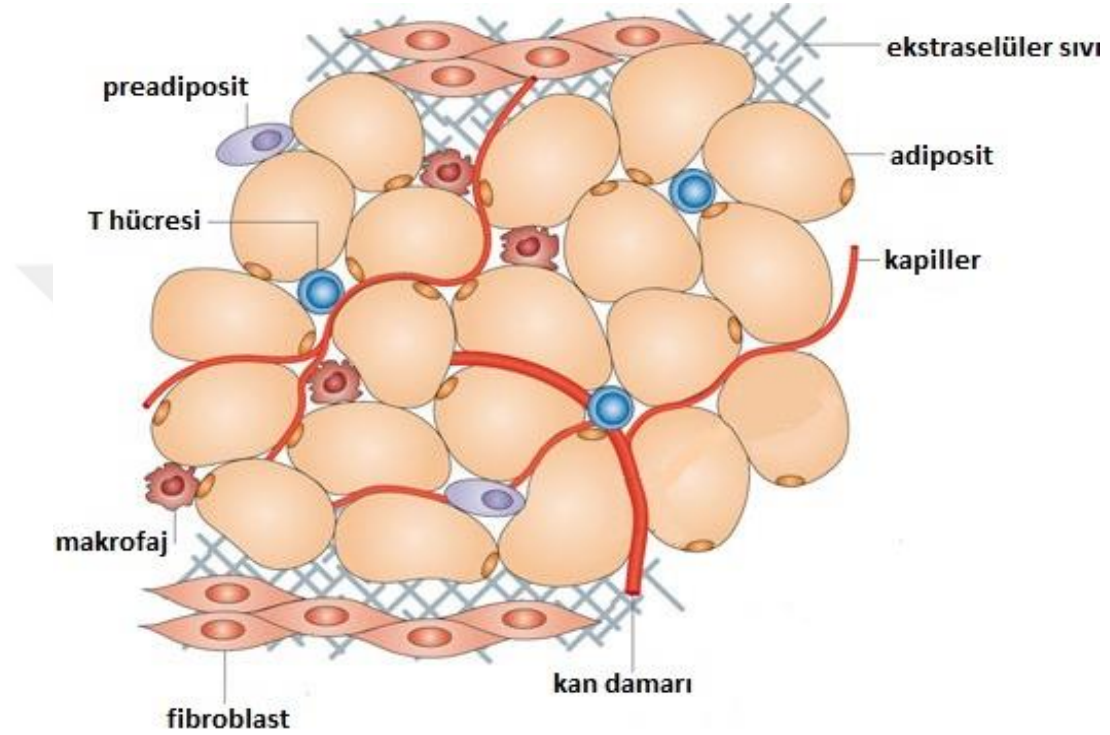
Adipositler, insanlarda hamileliğin 15. haftasından itibaren fibroblastların farklılaşarak preadipositlere dönüşümü ile meydana gelir. Adipositlerin miktarı genetik olarak belirlense de yaş, cinsiyet, beslenme alışkanlıkları ve çevre sıcaklığı gibi çeşitli faktörlere göre değişkenlik gösterir (Awad vd. 2010). Normal ağırlıktaki bir insanda YD vücut ağırlığının erkeklerde %15-20'sini, kadınlarda ise %20-25'ini oluşturur. Memelilerin çoğunda beyaz yağ doku (BYD) ve kahverengi yağ doku (KYD) olarak adlandırılan, birbirlerinden renk, dağılım, damarlanma ve metabolik aktivite açılarından farklılık gösteren, iki ayrı yağ dokusu bulunur. Bu iki yağ dokusuna ek olarak, ara form olarak kabul edilen bej (paucilocor) yağ dokusu da sınıflandırmaya dahildir (Cinti, 1999).



Şekil 2.1: Yağ dokusu dağılımı: A- Sıçanlarda BYD ve KYD dağılımı: İnterskapular KYD, perianal KYD, Retroperitoneal BYD, Mezenterik BYD, İnguinal BYD, Omental BYD, Perigonodal BYD, İntramüsküler BYD. **B- İnsanlarda KYD dağılımı:** Supraklaviküler KYD, Paravertebral KYD, Subrenal KYD. **C- İnsanlarda BYD dağılımı:** Epikardiyal BYD, Retraperinoeal BYD, Gluteal BYD, Omental BYD, Mezenterik BYD, Abdominal BYD, Gonodal BYD, Femoral BYD (Park, Kim, Bae, 2014).

2.1.1.1- Beyaz Yağ Dokusu

BYD çeşitli hücre tiplerinden oluşan gevşek bağ dokusudur. Adipositler, preadipositler, makrofajlar, endotel hücreleri, fibroblastlar ve T hücrelerini de kapsayan çok yönlü hücre birleşiminden oluşur. BYD bu bileşimi ile metabolizma ve inflamasyonda çok önemli bir konuma sahiptir. (Şekil 2.2)(Cinti, 2005).



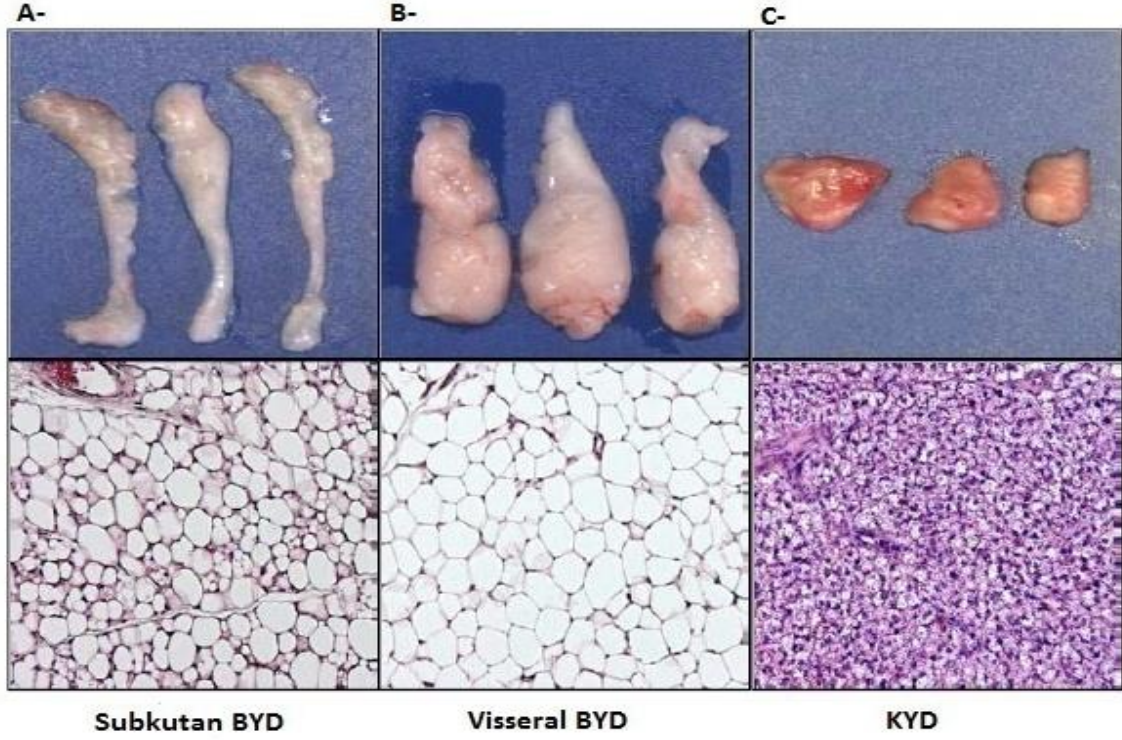
Şekil 2.2: Yağ dokusunun hücresel bileşenleri. Yağ dokusu olgun yağ hücreleri ve stromal vasküler fraksiyon hücreleri olarak adlandırılan preadiposit, makrofaj, endotel hücresi, fibroblast ve T hücresi gibi hücrelerden oluşur (Ouchi vd., 2011).

2.1.1.1.1-Beyaz yağ dokusunun dağılımı

BYD kalp, kan damarları, büyük lenf düğümleri, pankreas, yumurtalıklar, kemik iliği, gözler, prostat ve meme gibi birçok organda yer alır (Giordano, Frontini, Murano, 2005). Vücutta visseral ve subkutan olmak üzere 2 kompartmanda bulunur. Subkutan BYD: anterior BYD ve flank BYD olarak; visseral BYD: mezentrik BYD, retroperitoneal BYD, perianal BYD ve perigonadal BYD olarak vücutta dağılım gösterir (Bkz. Şekil 2.1 A-C).

Subkutan BYD ve visseral BYD arasında hücre büyüklüğü, membran reseptörleri, kana yağ asidi salgılama ve yağ depolama gibi fizyolojik ve metabolik fonksiyonları bakımından farklılıklar bulunur. Subkutan BYD heterojendir ve küçük multioküler adipositler ile birlikte olgun tek yağ damlacığı içeren adipositlerden oluşur. Visseral BYD daha uniformdur ve tek bir büyük yağ damlacığı içeren adipositlerden oluşur (Şekil 2.3.A)

(Awad vd. 2010). Visseral yağ dokusu subkutana göre daha fazla kan temini sağlayan zengin damar ağı ve yoğun sinir innervasyonuna sahiptir. Ayrıca, insanlarda total vücut yağının %10 kadarını oluşturur ve yaşlanmayla bu oran %20'lere kadar artabilir (Şekil 2.3.B) (İbrahim, 2010).



Şekil 2.3: Beyaz ve Kahverengi Yağ Dokusunun Mikroskopik Görüntüsü.

A- Subkutan BYD: Subkutan BYD heterojendir ve küçük multioküler adipositler ile birlikte olgun tek yağ damlacığı içeren adipositlerden oluşur. Visseral BYD daha uniformdur ve tek bir büyük yağ damlacığı içeren adipositlerden oluşur.

B- Visseral BYD: Visseral yağ dokusu subkutana göre daha fazla kan temini sağlayan zengin damar ağı ve yoğun sinir innervasyonuna sahiptir.

C- KYD: KYD'nin mikroskopik görüntüsü BYD dokusundan farklı olmasının sebebi; BYD'den daha fazla kan damarına ve adiposite sahip olmasıdır (Berry vd., 2013).

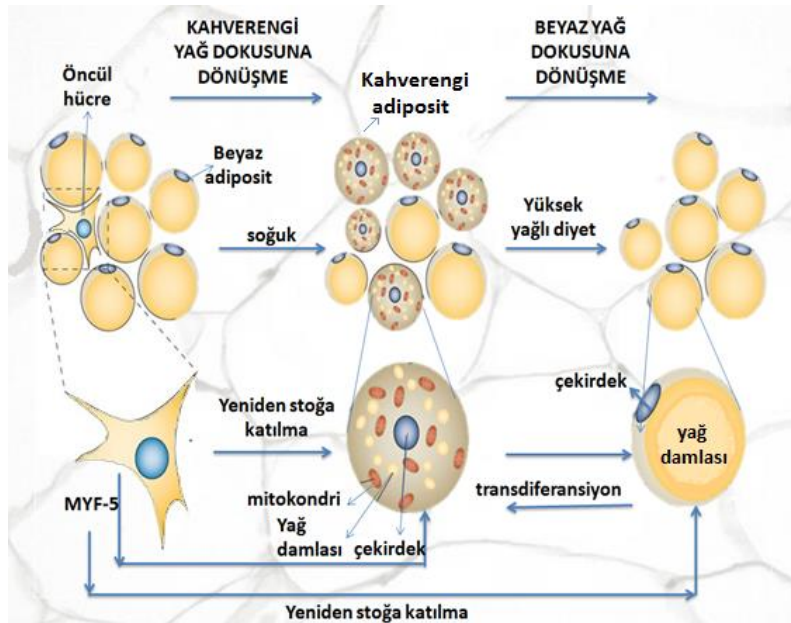
2.1.1.1.2-Beyaz yağ dokusunda enerji üretimi

BYD açlık durumunda organizma için enerji temin edebilen, yüksek enerjili yağ asitlerinin depolandığı bir dokudur. BYD'nin üç ana görevi vardır:

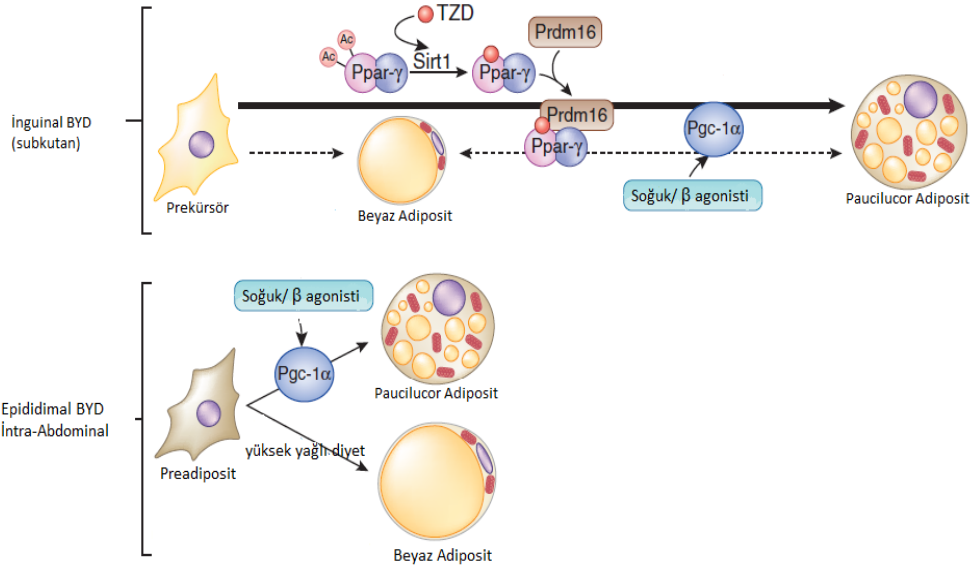
- 1-Metabolizma fazlası enerjiyi, trigliseritlere çevirerek depolamak,
- 2-İhtiyaç duyulduğunda depo trigliseritleri yağ asidine çevirmek ve enerji ihtiyacını karşılamak,
- 3-Sinirsel ve endokrin yol ile metabolik kontrolü sağlamaktır.

BYD adipositlerinde trigliseritler şeklinde depolanan enerji, kalori kısıtlaması ve egzersiz durumlarında diğer organların enerji ihtiyaçlarını karşılamak için BYD'den salıverilir. Bu salıverilme, lipoliz ile hücre içi trigliseritlerin hidrolizi sonucu bir molekül trigliseritten üç molekül yağ asidi ve bir molekül gliserol oluşumu ile gerçekleşir. Lipoliz, epinefrin ve norepinefrin etkisine bağlı olarak hormon duyarlı lipaz (HSL) tarafından kontrol edilir. Ayrıca HSL aktivitesi katekolaminler, insülin, büyüme hormonu ve tiroid hormonu tarafından da c-AMP-protein kinaz yolu ile düzenlenir. Lipoliz sonucu oluşan gliserol, glikoz sentezlemek için glikoneojenez gerçekleştiren dokular tarafından kullanılır. Oluşan yağ asitleri: kaslar tarafından oksidasyon için kullanılabilir olan albumine bağlı esterlenmiş yağ asitleri olarak, karaciğer tarafından ise oksidasyon, trigliserit sentezi ve depolanması için kullanılacak olan düşük yoğunluklu lipoprotein olarak kana salıverilir (Awad vd. 2010).

BYD'de trigliserit sentezleme ve hidroliz süreçleri hormonal, metabolik ve beslenme faktörleri ile belirlenir. Örneğin, adrenal korteksten glikokortikoidlerin, pankreastan glukagon sentezinin artması ve pankreastan insülin salgısının azalması yağ dokularından yağ asidi salgılanmasını artırır. BYD, organizmanın ihtiyaçlarına bağlı olarak hacimce büyür, farklılaşır ve daha sonra ise tekrar eski hacmine geri döner (Şekil 2.4)(Giordano vd. 2005). BYD'de yüksek yağlı diyet prokürsör hücrelerin beyaz adipositlere farklılaşmasını uyarır ve beyaz yağ dokusunda artışa sebep olur (Şekil 2.5). Bu düzenlemeler vücut homeostazını korumak için gereklidir. Bu süreçlerdeki değişiklikler BYD'deki trigliserolün mobilizasyonunda dengesizliğe sebep olur ve bu durum obezite ile sonuçlanabilir (Berry vd., 2013).



Şekil 2.4: Beyaz adipositlerin kahverengi adipositlere dönüşümünü gerçekleştiren faktörler (Bartelt ve Heeren, 2014).



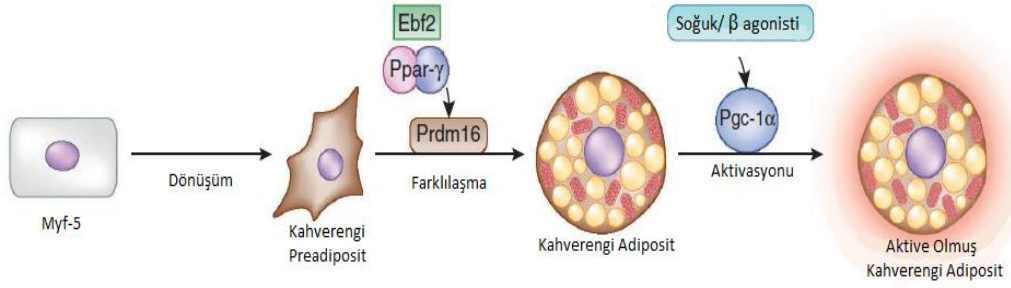
Şekil 2.5: Beyaz ve bej adipositlerin oluşum mekanizması.

Beyaz yağ dokusunun oluşumunda dokuda bulunan Ebf2 proteini, PRDM16'nin ekspresyonunu arttırmak için Ppar-γ ile birlikte çalışmaktadır. Yağ hücresi ve diğer hücrelerde transkripsiyon faktörü olarak bulunan Ppar-γ yağ hücrelerinin farklılaşmasının düzenlenmesi ve vücut yağ kitlesinin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Sylvia vd. 2010)

2.1.1.2- Kahverengi Yağ Dokusu

KYD, erişkinlerde çok az bulunması, adipositlerin de çok sayıda yağ damlacıkları içermesi, damarlanmanın fazla olması, UCP-1 içeren mitokondrilerinin olması ve termoregülasyonda görev alması özellikleri nedeni ile BYD'den ayrı olarak ele alınır (Bkz. Şekil 2.3-C)(Awad vd. 2010). Kemirgenlerdeki ve insanlardaki ana KYD depoları interskapular bölge ve derin sırt kaslarının etrafıdır (Bkz. Şekil 2.1-B). KYD depoları insanlarda bebeklik döneminde interskapular aralıkta görülür ve yetişkinliğe kadarki dönemde bu depolar geriler ve yok olur (Sylvia vd. 2010).

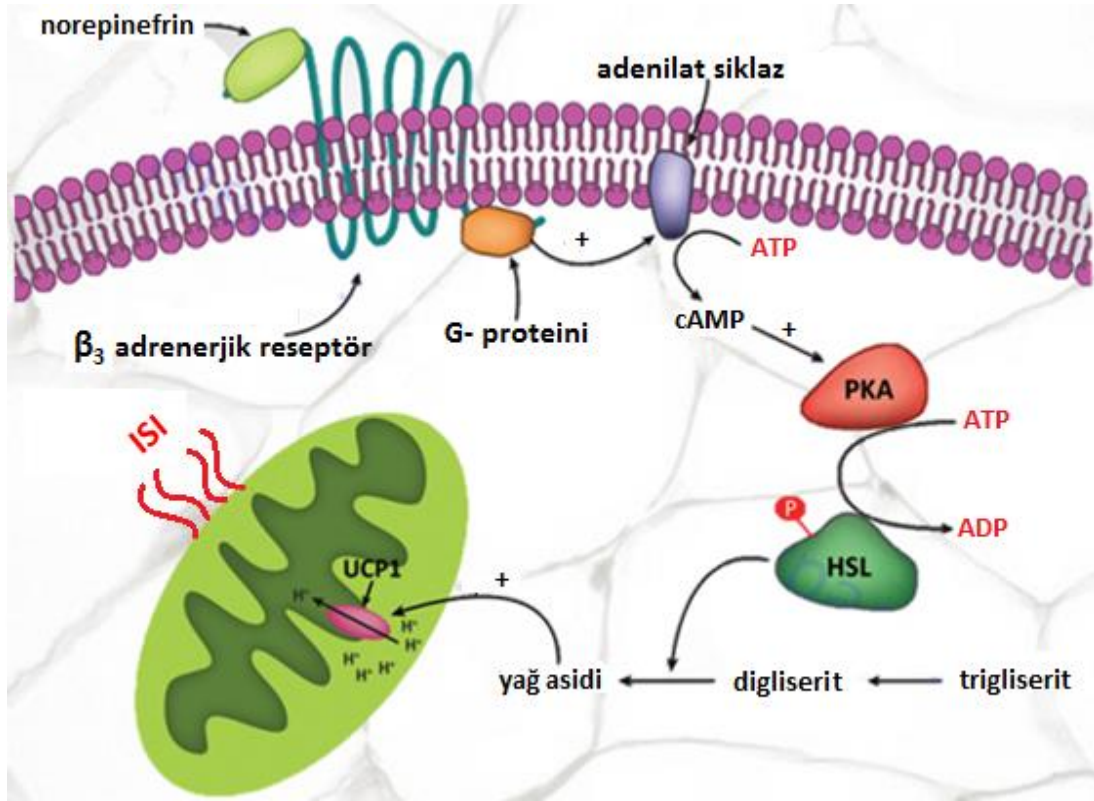
KYD embriyonik gelişim sırasında diğer yağ depolarından önce meydana gelir ve bu dokunun adipositleri, aynı zamanda iskelet kas hücreleri ve beyaz yağ dokusu adipositlerini meydana getiren embriyonik mezodermde yer alan Myf5 prekürsör hücrelerinden meydana gelir. Kahverengi yağ adipositleri oluşumunun mekanizması ise helix-loop-helix transkripsiyon faktör proteini (Ebf2) tarafından kontrol edilir ve çinko içeren farklılaşma faktörü (PRDM16)'nin ekspresyonunu arttırmak için peroksizom proliferatör aktive edici reseptör-γ (Ppar-γ) ile birlikte çalışmaktadır. Yağ hücresi ve diğer hücrelerde transkripsiyon faktörü olarak bulunan Ppar-γ yağ hücrelerinin farklılaşmasının düzenlenmesi ve vücut yağ kitlesinin oluşumunun kontrolünde önemli rol oynar. Oluşan bu üçlü kompleks yapı KYD preadipositlerinin KYD adipositlerine farklılaşmasını gerçekleştirir. Soğuk ya da ortama enjekte edilen β-3 adrenerjik reseptör agonisti, peroksizom proliferatör aktive edici faktör-γ reseptör koaktivatör-α'yı (Pgc-1α) aktif ederek kahverengi adipositlerdeki enerji üretimini artırır (Şekil 2.6)(Sylvia vd. 2010).



Şekil 2.6: Kahverengi yağ adipositlerinin oluşum mekanizması: Ebf2 proteini, PRDM16'nın ekspresyonunu arttırmak için Ppar-γ ile birlikte çalışmaktadır. Yağ hücresi ve diğer hücrelerde transkripsiyon faktörü olarak bulunan Ppar-γ yağ hücrelerinin farklılaşmasının düzenlenmesi ve vücut yağ kitlesinin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Sylvia vd. 2010).

2.1.1.2.1- Kahverengi yağ dokusunda enerji üretimi

Kemirgenlerde KYD aktivitesinin artışı sıklıkla soğuğa ve artan besin alınımına bağlı olarak sempatik sinir sistemi ile düzenlenir (Cannon, Nedergaard, 2004, Berry vd., 2013). Sıcak kanlı hayvanlar çeşitli mekanizmalarla sıcaklıklarını optimal düzeyde tutma kapasitesine sahiptir. Bu mekanizmalardan biri kasların etkinliği ile gerçekleşen ısı düzenlenmesidir. Soğuğa maruziyet sempatik sinir sistemini aktive ederek damarlarda vazokonstriksiyona ve vücut kaslarında titremeye neden olarak vücut sıcaklığını düzenler. Bir diğeri ise, soğuğa maruziyet sonucunda KYD mitokondrilerinde bulunan UCP-1 aracılığı ile ATP yerine termojenez için ısı üretilmesidir. Buna titremeye bağlı olmayan termojenez denmektedir. Soğuğa adaptasyon sırasında farklı vücut bölümlerinde, BYD, KYD'ye dönüşür (özellikle inter-skapular bölgede) ve vücut ısısının düzenlenmesine yardımcı olur (Bkz. Şekil 2.4)(Cinti, 2005). Soğuğa maruziyet ile sempatik sinir sisteminin uyarılması sonucunda noradrenerjik lifler KYD üzerindeki etkilerini arttırırlar. Sempatik sinir sisteminin uyarılması ile noradrenerjik nöronlardan salıverilen norepinefrin, β -3 adrenoreseptör aracılığı ile adenil siklaz aktivasyonunu sağlar ve c-AMP artışını gerçekleştirir. Hücre içinde artan c-AMP, protein kinaz A'yı aktive ederek hormon duyarlı lipazın aktive edilmesini sağlar. Aktive olan hormon duyarlı lipaz etkisi ile lipoliz ve enerji harcanması artar. Ayrıca mitokondriyi de UCP-1 ekspresyonunu arttırmak için uyarır (Awad vd. 2010).



Şekil 2.7: Kahverengi yağ adiposit mitokondrisinde UCP-1 aracılığı ile ısı üretim mekanizması:

Sitozolik serbest yağ asitlerinin konsantrasyonunun artması, ısı kaybını telafi etmek için doğrudan UCP-1'in aktivitesinin artması ile mitokondrilerde ısı enerjisi üretiminin gerçekleşmesine sebep olurlar (Cinti, 2005).

Lipoliz sonucu oluşan yağ asitleri esterleşmiş anyon formunda, UCP-1'in güçlü aktivatörleri olarak yer alırlar. Sitozolik serbest yağ asitlerinin konsantrasyonunun artması, ısı kaybını telafi etmek için doğrudan UCP-1'in aktivitesinin artmasına böylece yine β -3 adrenoreseptör aracılı mekanizma ile mitokondrilerde ısı enerjisi üretiminin gerçekleşmesine sebep olur (Bkz. Şekil 2.7)(Shimizu vd., 2005). Protonlar eşzamanlı ATP sentezi olmaksızın mitokondri matriksine girdiklerinde, UCP-1'de önceden protein gradiyentinde depolanan enerjinin ısı enerjisi olarak ortaya çıkmasını sağlar (oksidatif enerji ısıya dönüşür). Yapılan bir çalışmada oda sıcaklığından alınan farelerin, soğuk ortama getirildiklerinde vücut ısını korumak için enerji tükettikleri gözlemlenmiştir. Bu durum, KYD'de bulunan UCP-1'in aktifleşmesi ile termojenik yanıtın oluşması sırasında harcanan enerji olarak ifade edilmiştir (Awad vd. 2010).

KYD'den salgılanan endokrin faktörlerin, termojenik uyarılara yanıt olarak salgılandığı düşünülmüş ve bazı yazarlar tarafından *batokinler* olarak adlandırılmıştır. KYD batokinlerinin beyaz yağ dokusu adipokinlerinden farklı etkilere sahip olduğu gösterilmiş olup, diğer dokulara ve merkezi sinir sistemine yüksek enerji harcamalarda sistemik adaptasyonlar aracılığı ile yardımcı olarak işlev gördükleri önerilmiştir (Villarroya, Cereijo, Villarroya, 2013). Genel katabolik süreçlerde KYD'ye

oksidasyon sırasında metabolik destek sağlarlar. KYD'de termojenik aktivasyon sonucunda salgılanan batokinlerin, sempatik sinir sisteminin aktivitesini etkiledikleri ve böylece termojenik aktivasyona sistemik yanıtı koordine ettikleri düşünülmektedir (Villarroya vd., 2013).

2.1.1.3- Bej Yağ Dokusu

Bej yağ dokusu, BYD'nin KYD'ye dönüşümü sırasında ortaya çıkan ara formdur (Cinti, 2005) ve genel olarak inguinal bölgede bulunur (Sylvia vd. 2010).

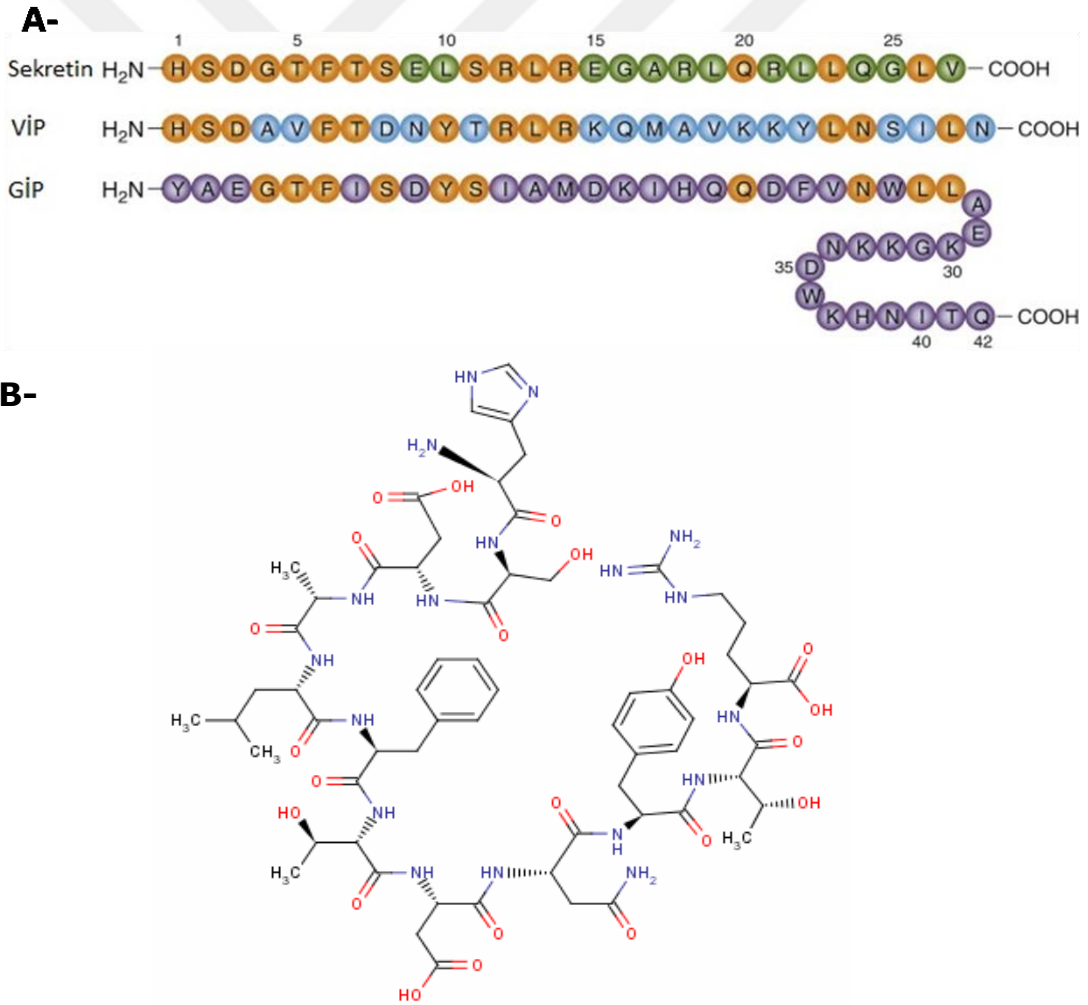
Inguinal yağ dokusunda, β -adrenerjik stimülasyon, prokürsör hücrelerin farklılaşmasını baskın bir şekilde tetikler. Tip 2 diyabetli insanlar için reçete edilen bir grup glukoz düşürücü ilaç olan tiazolidindion (TZD)'ler insülin duyarlılığını ve düşük kan şekeri seviyesini artıran PPAR- γ agonistidir. Ayrıca TZD yeni adiposit oluşumunu uyarır bu etkisini hem Prdm16'nın stabilitesini arttırarak hem de Prdm16'nın sirtuin-1(Sirt1)'e bağımlı deasetilasyonunu arttırarak BYD adipositlerinin bej adipositlere dönüşümünü sağlar. Ayrıca β -agonistleri ya da soğuk, Pgc-1 α 'nın ekspresyonunu ve aktivitesini arttırarak bej yağ adipositlerin oluşumunu uyarır. Epididimal BYD'de, β -adrenerjik aktivatörler, termojeneze adaptasyon için bej yağ adipositlerin oluşumunu da sağlamaktadırlar (Bkz. Şekil 2.5) (Berry vd., 2013).

Bej adipositlerin termojenik profilleri iki yönlüdür. Yapılan bir çalışmada gösterildiği üzere, farelerde soğuk stres ile bej yağ adipositlerinden elde edilen KYD adipositlerinin UCP-1'e sahip olduğu ve termojenik aktiviteye katıldıklarına işaret edilmiştir. Daha sonra fareler sıcak ortama geri alındıklarında dönüşen bu bej yağ adipositlerinin UCP-1 aktivitesini kaybettikleri (Berry vd., 2013), UCP-1 proteinin genini yalnızca β -adrenerjik reseptör agonistleri ya da Ppar- γ gibi aktivatörlere yanıt olarak eksprese ettikleri gösterilmiştir (Sylvia vd. 2010).

2.2- Vazoaktif İntestinal Peptit (VİP)

Vazoaktif intestinal peptit (VİP) ile ilgili ilk bilgi 1970 yılında Said ve Mutt'un akciğer hasarlı hastalardaki sistemik hipotansiyon üzerine yaptıkları çalışmalarda vazodilatör etkisi ile gösterilmiş ve ardından yaptıkları çalışma ile domuz ince bağırsağından 28 aminoasit dizili bir peptit olan VİP'i izole edip tanımlamışlardır (Said ve Mutt, 1970). VİP'in gastrointestinal sistemdeki bu keşfinden sonra, sinir sisteminde; korteks, amigdala, striatum, hipokampus ve bazı omurilik kısımlarında da bulunduğu gösterilmiştir (Said, Rosenberg, 1976).

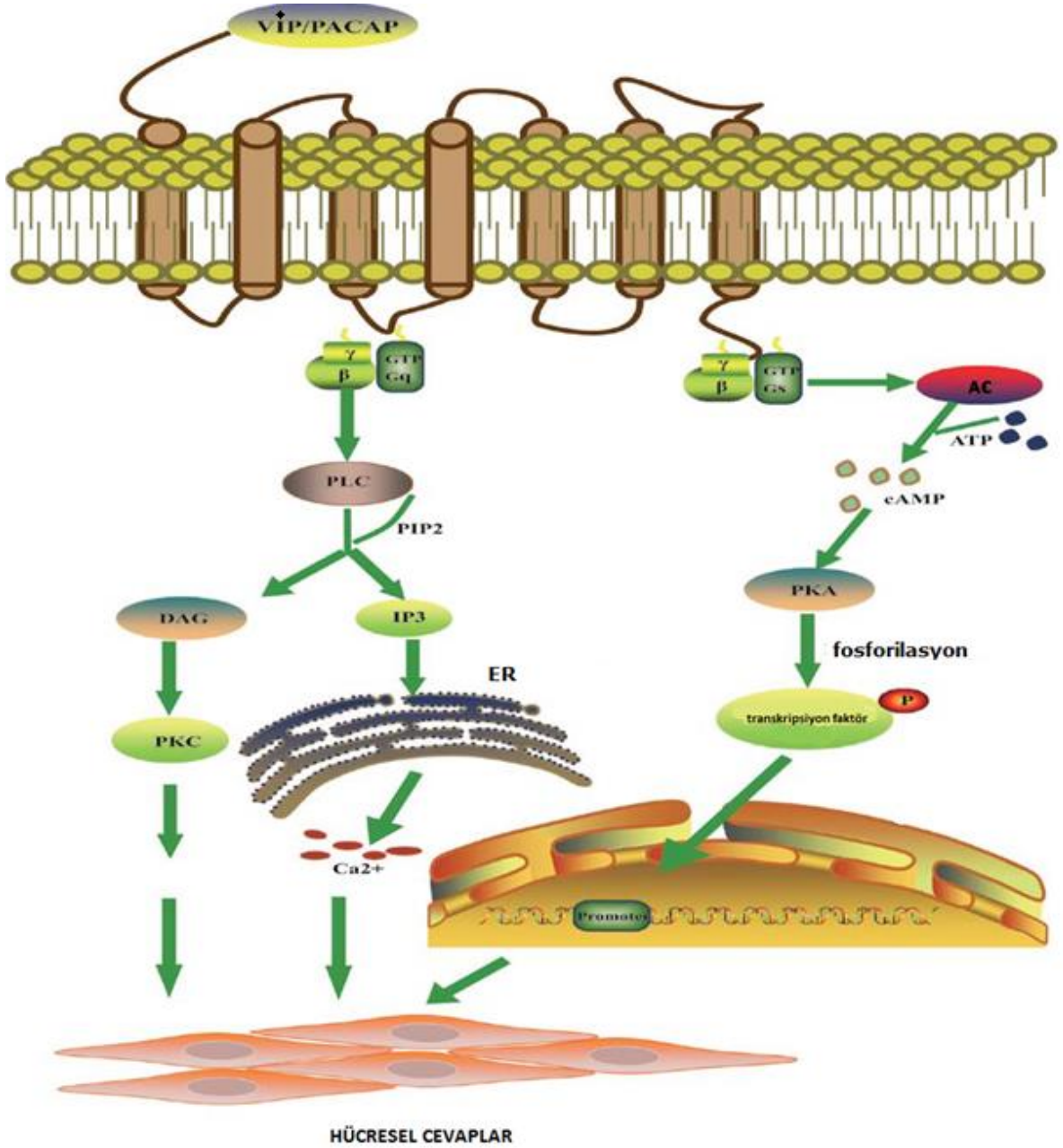
VİP, sekretin ve glukagon ailesinde olan diğer hormonlar (sekretin, glukagon, büyüme hormonu salıverdirici hormon (GHRH), gastrik inhibitör peptit (GİP) gibi hormonlar) ile yapısal olarak benzerdir ve bu benzerliği nedeni ile VİP, sekretin peptit ailesinin üyesi olarak sınıflandırılmaktadır. (Şekil 2.8 A-B)(Akesson, Ahre, Edgren, Degerman, 2005).



Şekil 2.8: VİP'in moleküler Yapısı A- VİP'in, Sekretin ve GİP ile moleküler olarak yapısal benzerliği nedeni ile VİP sekretin ailesi içine alınmıştır. **B-**VİP'in 2 boyutlu moleküler yapısı (<https://justjuliewrites.files.wordpress.com/2013/05/vip47900-24-3.png>).

Günümüzde VIP'in bilinen iki reseptörü mevcuttur. VIP için ilk reseptör sıçan akciğerinden izole edilmiş ve VPAC-1 olarak tanımlanmış (Ishihara vd. 1992), ikinci reseptör ise Lutz tarafından bulbus olfactoriustan izole edilmiş ve VPAC-2 olarak tanımlanmıştır (Lutz vd. 1993). VPAC-1 karaciğerde, akciğerde, bağırsakta, pankreasta, aortta, kalpte, kan damarlarında, T lenfositlerinde ve MSS'de (serebral korteks, amigdala, hipokampus) yaygın olarak ifade edilir (Gozes, Fridkin, Hill, 1999, Miyata, Sato, Hino, 1998, Nussdorfer, Malendowicz, 1998, Sreedharan, Patel, Huang, 1993, Usdin, Bonner, Mezey, 1994). VPAC-2 bulbus olfactorius, talamus ve suprakiazmatik nukleus içinde yaygın olarak ifade edilir ve hipokampus, beyin sapı, omurilik ve dorsal kök gangliyonlarında daha düşük konsantrasyonlarda bulunur (Gozes vd. 1999, Sreedharan vd. 1993, Usdin vd. 1994). Ayrıca aortik endotelyum, kalp, pankreas, renal medulla, adrenal korteks, iskelet kasın da bulunmakla birlikte (Adamou, Aiyar, Van-Horn, 1995, Gozes vd. 1999, Nussdorfer vd. 1998, Usdin vd. 1994, Wei, Mojssov, 1996), VPAC reseptörlerinin varlığı solunum yolu epitelyumu, kılcal damarları çevreleyen makrofajlar ve pulmoner arter subintimasında da gösterilmiştir (Miyata vd. 1998, Petkov vd., 2003, Sreedharan vd. 1993).

VIP reseptörleri G protein aracılı reseptörlerdir ve bu G proteinleri G_s , G_i , ve G_q alt tipleri olarak farklılıklar gösterir (Dickinson, Fleetwood-Walker, Mitchell, Lutz, 1997). VIP'in reseptörleri aracılığı ile oluşan G_s proteininin uyarımı sonucu adenilat siklaz (AC) aktivasyonu ile hücredeki siklik adozin monofosfat (c-AMP) miktarını arttırarak hücresel cevabın başlamasını gerçekleştirir (Laburthe, Couvineau, 2002). VPAC-2 reseptörü aracılığı ile oluşan G_i proteininin uyarılması ile birlikte AC aktivasyonu inhibe olur ve c-AMP düzeylerini azaltarak hücresel işlevlerini yerine getirir (Luo vd., 1999). Bir diğer G protein tipi olan G_q uyarılması sonucunda fosfolipaz C (PLC) sinyal iletim yollarının stimülasyonu ile fosfotidilinositol-4,5-bifosfat (PIP_2)'ı diaçilgliserol (DAG) ve inositol-1,4,5-trifosfat (IP_3)'a ayırır. IP_3 , endoplazmik retikulumda (ER) Ca^{+} salgılanmasına neden olarak, DAG ise protein kinaz C'yi (PKC) aktive ederek hücresel cevapları meydana getirir (Tang, Young, Xie, Li, Yang, 2014)(Şekil 2.9).



Şekil 2.9: VIP'in sinyal iletiminin moleküler mekanizması:

VIP'in hücrel cevaplarına, VIP'in reseptörlerine bağlanması ile G_s ve G_q uyarımı sonucu AC ve PI sinyal iletim yollarının stimülasyonu aracılık eder (Tang vd., 2014).

VIP, merkezi ve periferik sistemde yaygın dağılımına paralel olarak çok geniş fizyolojik etkilere sahiptir. Gelişme-büyüme, sirkadiyen ritim, üreme, kardiovasküler sistemlerin işlevleri ve kanser ile ilgili fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerde rolü vardır (Colwell vd., 2017, Fahrenkrug, Emson, 1982, Falsetti vd., 1988, Sawangjaroen, Cuurlewis, 1994) (Laburthe vd. 2007, Willis, Ottesen, Wagner, Sundler, Fahrenkrug, 1988). VIP'in nörotransmitter olarak işlev gördüğü organların düz kaslarında adrenalin ve asetilkolin reseptörleri bulunmayan nöronların (nonadrenerjik ve nonkolinerjik innervasyon) uyarılması ile kas gevşemesine aracılık

edebiliyor olabileceğine işaret edilmiştir (Angel, Go, Schmalz, Szurszewski, 1983, Gibson, Tucker, 1982, Goyal, Rattan, Said, 1980, Grider, Cable, Said, Makhoulouf, 1985a, Grider, Cable, Said, Makhoulouf, 1985b, Matsuzaki, Hamasaki, Said, 1985). Ayrıca VIP, parasempatik sinir sistemi aktivitesi aracılığı ile pankreasta insülin sekresyonunu uyararak etki gösterir (Sanlioglu, Karacay, Balci, Griffith, Sanlioglu, 2012), bağırsakta, pankreasta ve bronşlarda ekzokrin salgıları düzenler, su ve elektrolit çıkışını uyarır (Dartt, Baker, Vaillant, Rose, 1984)(Lundberg, Anggard, Fahrenkrug, 1981, Nathanson, Widdicombe, Barnes, 1983). VIP, dokuları oksidatif hasar, inflamasyon gibi ciddi toksik etkilere karşı da koruyucu özelliğe sahiptir (Giachetti, Said, Reynolds, Koniges, 1977, Johansson, Lundberg, 1981). İnflamasyonda makrofojlara ve mikroglialar tarafından sitokin, kemokin ve serbest radikal üretimini inhibe eder (Ibrahim, 2010) (Tablo 2.2). Ayrıca, yapılan çalışmalarda VIP'in lipolize de aracılık ettiği de belirtilmiştir (Hauner, Glatting, Kaminska, Pfeiffer, 1988).

Tablo 2.2: VIP'in farklı istemlerdeki fizyolojik etkileri (Said, 1986).

Kardiyovasküler Sistem	Periferik, splanknik, koroner, ekstrakranial ve serebral damarların vazodilatasyonu, hipotansiyon üzerine inotropik etki.
Solunum Sistemi	Bronkodilatasyon, pulmoner vazodilatasyon, bronşiyal sekresyonun uyarılması.
Sindirim Sistemi	
Yemek Borusu	Özofagus sfinkterinin gevşemesi
Mide	Fundus düz kas gevşemesini sağlar ve asit salgısını baskılar.
Pankreas ve Karaciğer	Su ve CHO ₃ (bikarbonat) salgılanmasının düzenlenmesi ile artmış safra akışı sağlar.
Safra Kesesi	Düz kas gevşemesi sağlar.
İnce ve Kalın Bağırsak	Su absorpsiyonunu inhibe eder, kolonda düz kas gevşemesini sağlar.
Biyokimyasal/Metabolik	Adenilat siklaz aktivitesinin uyarılması, glikoneojenez, lipoliz.
Endokrin Fonksiyonları	
Pankreas	İnsülin, glukagon ve somatostatin salgılanması.
Pitüiter-hipotalamus	Prolaktin, GH ve LH salgılanmasının uyarılması, somatostatin salgılanmasının baskılanması
Adrenal	ACTH benzeri etki.
Böbrek	Juxtaglomerular hücrelerde renin salgılanmasını uyarır.
MSS	Serebral kortikol ve omurilik nöronlarının uyarılması, glikoneojenez ve glikoz kullanımı.
Bağışıklık Sistemi	T-Lenfositlerin mitojen kaynaklı dönüşümünün inhibisyonu, Ig sentezinin uyarılması, mast hücrelerinde histamin salgılanmasının inhibisyonu, Trombosit agregasyonu ve sekresyonunun inhibisyonu.

VİP'in N terminal bölgesi ile %68 homoloji gösteren ve aralarındaki yüksek dizi homolojisi nedeni ile VPAC-1 ve VPAC-2 reseptörlerine eşit afinitiyeye sahip (ayrıca PAC-1 olarak adlandırılan spesifik reseptörü bulunan) olan pitüiter adenilat siklaz aktive edici polipeptit (PACAP) bulunmaktadır. VİP ve PACAP ile yapılan çalışmalarda, PACAP ve VİP'in sahip olduğu lipolitik etkinin, gıda alımından sonra insülin sekresyonunu daha da güçlendirdiği düşünülmektedir. VİP'in aktivitesi cAMP seviyesinde artışa neden olarak protein kinaz A(PKA)'nın aktifleşmesini sağlamaktadır. Aktif olan PKA'nın doğrudan etkisi veya voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları vasıtası ile Ca^{+2} düzeyinin yükselmesi ile insülin salgısı yükselmektedir. Ayrıca, lipoliz sonucu kanda artan serbest yağ asidi seviyelerinin, karaciğerde insülin sekresyonunu arttırıcı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Stein vd., 1996). Lipoliz epinefrin, norepinefrin, insülin, glukagon etkisine bağlı olarak hormon duyarlı lipaz (HSL) tarafından kontrol edilmektedir. İnsülin, trigliseriti yağ asidi ve gliserole parçalayan hormon duyarlı lipazı inhibe ederek, kana yağ asidi salıverilmesini durdurmaktadır. Ayrıca, yağ dokusunun kapiller duvarında yer alan lipoprotein lipazı aktive ederek trigliseritleri yağ asitlerine parçalamaktadır, yağ asitleri yağ hücreleri içine tekrar emilir ve trigliserite dönüştürülerek depo edilmektedir. PACAP ve VİP'in sıçan adipositlerindeki lipoliz artışına aracılık eden reseptör alt tipinin aydınlatılmasını amaçlayan bir çalışmada, epididimal BYD'de spesifik VİP/PACAP reseptör agonistleri ve antagonistleri kullanılarak, VİP ve PACAP ile uyarılan VPAC-2'nin protein kinazı aktive ederek lipolize aracılık ettiği RT-PCR ve Western-Blot çalışmaları ile gösterilmiştir (Akesson, Ahré, Edgren, Degerman, 2005). PACAP protermojenik bir nöropeptit olup soğuk strese adaptasyon sırasında rol oynamaktadır (Banki vd., 2014). Ayrıca BYD'de sempatik sinir sistemi aktivitesi ile lipolize neden olurken (Agarwal, Halvorson, Legradi, 2005), interskapular KYD'de UCP-1 aracılığı ile termojenez aracılık ederek (Masuo, Noguchi, Morita, Matsumoto, 1995) hem enerji ihtiyaçlarına hem de soğuk strese yanıt olarak yağ dokusu depolarını uyaran sempatik sinir aktivitesini düzenler. Buna ilaveten yapılan bazı çalışmalarda, soğuğa maruz bırakılan sıçanlarda, VİP midede ülser gelişimini engellemiş ve mide dokusunu korumuş (Tunçel, Erkasap, Şahintürk, Doğruyol- Ak, Tunçel, 1998), damarların norepinefrine verdiği yanıtı arttırdığına işaret edilmiştir (Tuncel vd. 1996).

VİP'in yağ dokusu ile yapılan çalışmalarında, VİP'in yağ dokusunda lipoliz üzerine etkili olduğu, epididimal beyaz yağ dokusunda insülin varlığında veya yokluğunda VPAC-2 reseptörü aracılığı ile hem anabolik hem de katabolik süreçlere dahil olduğu gösterilmiş olup ayrıca VİP ile ortak reseptörleri kullanan PACAP'ın soğuğa adaptasyon süreçlerinde beyaz ve kahverengi yağ dokusuna sempatik sinir sistemi üzerinden etki gösterdiği ile ilgili yapılan çalışmalar mevcut olup VİP'in soğuk stres maruziyeti ile farklı yağ doku tiplerinde nasıl etkilendiği ile ilgili çalışma, bu bağlamda yaptığımız literatür araştırmalarında bulunamamıştır. Bu bilgiler ışığında planladığımız tez çalışmasında: tüm subkutan beyaz ve interskapular kahverengi yağ dokularında (adipositler ve civar dokular) ve

adipositlerde (izole edilmiş) gerek VIP'in gerekse reseptörlerinin varlığını araştırmak ve soğuğa maruziyet ile oluşan stres koşullarında, ekspresyonunun ve protein ifadelerinin nasıl etkilendiğini araştırmaktır.



3- GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1- Kullanılan Materyaller

3.1.1- Kullanılan cihazlar

- Buzdolabı, Bosch, Türkiye
- -80 derin dondurucu, Panasonic, Japonya
- SWBR Serisi Çalkalamalı Su Banyosu, SHEL-LAB, ABD
- Mikrosantrifüj, Sigma 1-14K, ABD
- Homojenizatör, Vibra-cell VCX 750
- Sonikatör cihazı, Sonics & Materials Inc., CT, ABD
- µdrop plate, Thermo Fisher Scientific, ABD
- Multiscanda, Thermo Fisher Scientific, ABD
- Thermal cycler, BIO-RAD, ABD
- Light Cycler Nano Instrument, ROCHE, Almanya
- Qubit 2,0 fluorometer, Thermo Fisher Scientific, ABD
- Mini Gel tank, Thermo Fisher Scientific, ABD
- Power Ease, Güç Kaynağı 90 W, Thermo Fisher Scientific, ABD
- iBlot 2 Dry Blotting System, Thermo Fisher Scientific, ABD
- iBind Western Sistemi, Thermo Fisher Scientific, ABD
- Kodak EI Logic 1500 imaging system, Kodac, ABD
- Kodak Molecular imaging program, Kodac, ABD

3.1.2- Kullanılan materyaller

3.1.2.1- Adiposit izolasyon materyalleri

- Kreps- Ringer HEPES buffer
- Collagenaz II, Sigma, ABD
- Hücre süzgeci, 100µm, BD, ABD

3.1.2.2- RT-PCR materyalleri

- Tripure isolation reagent Roche Life Science, Almanya
- Kloroform
- İsoproponol
- Etanol
- Elüsyon tamponu, Thermo Fisher Scientific, ABD
- Transkriptör First Strand c-DNA Sentez Kit, Roche Life Science, Almanya
- Loc Primer, Roche Life Science, Almanya
- VIP primer, Roche Life Science, Almanya
- VPAC-1 primer, Roche Life Science, Almanya
- VPAC-2 primer, Roche Life Science, Almanya

3.1.2.3- Western- Blot materyalleri

- Qubit pprotein assay kit Invitrogen/Life Technologies, ABD
- NuPAGE LDS Sample Buffer Invitrogen/Life Technologies, ABD
- NuPAGE Sample Reducing Agent Invitrogen/Life Technologies, ABD
- NuPAGE® MES SDS Running Buffer Invitrogen/Life Technologies, ABD NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.5 mm Invitrogen/Life Technologies
- SeeBlue Plus2 Prestained Standard Invitrogen/Life Technologies, ABD
- MagicMarc XP Prestained Standard Invitrogen/Life Technologies, ABD
- iBlot Transfer Stack, PVDF Regular Invitrogen/Life Technologies, ABD
- iBlot Transfer Stack, Nitrocellulose Regular, Invitrogen/Life Technologies, ABD
- İbind Solution Kit, Invitrogen/Life Technologies, ABD
- Goat Anti-Mouse IgG, HRP konjugat, Millipore, ABD
- Beta-Actin Antibody, Novusbio, ABD
- VIP antybody, Novusbio, ABD
- Goat Anti-Rabbit IgG, HRP konjugat, Millipore, ABD
- VPAC-1 Antybody, Millipore, ABD
- VPAC-2 Antybody, Millipore, ABD
- Novex ECL Chemiluminescent substrate reagent kit, Invitrogen/Life Technologies, ABD

3.2- Deney Hayvanları

Deneylerde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezinde yetiştirilen 200-250 gr ağırlığında erişkin erkek *Wistar albino* sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar soğuk stres uygulanmasının devam ettiği beş gün boyunca Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Nörofizyoloji Bilim Dalı, Nörofizyoloji araştırma laboratuvarında, standart sıçan sanayi yemleri ve çeşme suyu ile beslenmiştir. Tüm deney hayvanı çalışmaları Hayvan Etik Kurulu'nun izni (457/2015 dosya kayıt ve karar numarası ile) alındıktan sonra Fizyoloji Anabilim Dalı, Nörofizyoloji araştırma laboratuvarında yapılmıştır. Kontrol (n=8, n=6) ve soğuk stres olmak üzere (n=8, n=6) iki grup bulunmaktadır. Bu gruplar ise yağ dokusu tipine göre olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Gruplarda VIP ve reseptörlerinin ekspresyonu ve protein miktar tayini yapılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Deney grupları

Gruplar	Hayvan sayısı	Uygulamalar
Kontrol BYD	n=8	RT-PCR
Kontrol KYD	n=8	RT-PCR
Soğuk Stres BYD	n=8	Soğuk stres, RT-PCR
Soğuk Stres KYD	n=8	Soğuk stres, RT-PCR
Kontrol BYD saf adiposit	n=6	Adipositlerin izolasyonu, RT-PCR, Western-Blot
Kontrol KYD saf adiposit	n=6	Adipositlerin izolasyonu, RT-PCR, Western-Blot
Soğuk Stres BYD saf adiposit	n=6	Soğuk stres, Adipositlerin izolasyonu, RT-PCR, Western-Blot
Soğuk Stres KYD saf adiposit	n=6	Soğuk stres, Adipositlerin izolasyonu, RT-PCR, Western-Blot

3.3- Soğuk Stres Uygulaması

Soğuk stres prosedürü: sıçanlar belirlenen ardışık beş gün içerisinde +4°C de tahta kutu içerisinde, 2 saat soğuk strese tabi tutuldu (Tunçel vd. 1996). Altıncı günde sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülüp, beyaz yağ dokusu deri altından ve kahverengi yağ dokusu interskapular aralıktan hızlıca alındı. Yağ dokusu parçalar halinde kesilerek, RT-PCR ve Western-Blot analizleri için iki eşit parçaya ayrıldı ve -80°C de çalışma yapılacak güne kadar muhafaza edildi.

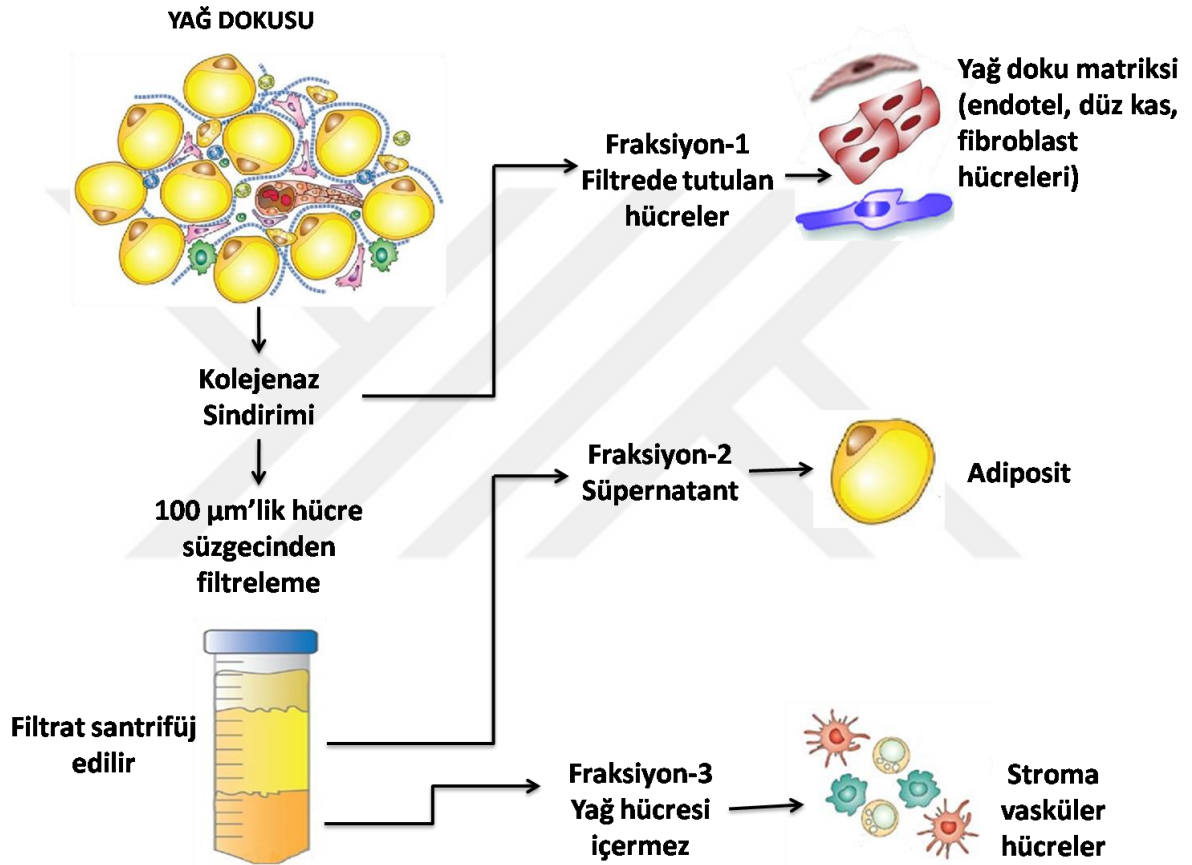
3.4- Adipositlerin İzolasyonu

Daha önceden -80°C'de muhafaza edilen yağ dokuları (n=6), çözdürülüp küçük parçalara ayrıldı ve buz üzerinde 25ml'lik dilu-vial tüpler içerisinde 1 ml sindirim tamponuna (1X KrebsRinger HEPES 1-2mg/ml Collagenase II (Sigma C6885)) konuldu.

Hazırlanan örnekler, su ısıtmalı çalkalama cihazında 37°C'de 45-60 dakika, ~150 rpm de sürekli çalkalanarak inkübe edildi. 50 ml'lik konikal tüpe hücre süzgeçleri (100 micron, BD falcon# 352360) yerleştirildi ve

sindirilmiş doku hücre süzgecinden süzüldü. Böylece saf adipositleri içeren süspansiyon elde edildi.

Filtre ettiğimiz dokulardan geriye kalan süspansiyon 500g'de 5 dakika üçer kez santrifüj edildi. Üçüncü santrifüjün sonucunda süpernatant tüpten uzaklaştırıldı böylece tüpün tabanına yerleşmiş olan saf adipositler elde edildi. Yapılan çalışmalar sonucunda RNA ve Protein uygulamalarına hazır saf adipositler, RT-PCR ve Western-Blot analizleri için kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Adipositlerin izolasyonu: Çıkarılan BYD ve KYD'lerden, saf adiposit elde edilmesi sırasında; kollajenaza tabi tutulan yağ dokularının; 100 µm'lik filtreden geçirilip, üç kere santrifüj edilmesi ve sonucunda yağ dokusu matrisinde bulunan, endotel, düz kas, fibroblast ve stromal vasküler hücrelerden ayrıştırılması ve saf adipositler elde edilmesi basamakları (Awad ve Bradford, 2010, s. 25)

3.5- Reel-Time PCR Tekniği ile VİP ve reseptörleri olan VPAC-1 ve VPAC-2'nin mRNA Ekspresyonu

Tüm beyaz ve kahverengi yağ dokusu ve saf beyaz ve kahverengi yağ dokusu adipositlerinden izole edilen total mRNA'lardan hedef mRNA'lar olan VİP, VPAC-1, VPAC-2 ve kontrol geni olan GAPHD mRNA'larının rakamsal değerlerini tespit etmek için RT-PCR tekniği kullanıldı.

3.5.1- Dokulardan total RNA izolasyonu

1. -20°C'de bulunan yağ dokuları ve saf adipositlerin her bir örneğine 1 ml Tri-Pure izolasyon reaktifi eklendi ve buz üzerinde sonik parçalayıcı ile homojenize edildi.
2. Homojenize edilen dokular 12000g'de ve +2°C'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant yeni bir ependorfa alındı.
3. Homejenize edilen yağ dokusunun fazlara ayrılmasını içeren bu basamakta, homojenizat üzerine 0,2 ml kloroform eklendi, 5 dakika inkübe edildi. 12000g'de ve +2°C'de 15 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonucunda 3 farklı faz elde edildi ve en üste oluşan total RNA'yı veren faz yeni bir ependorfa alındı.
5. Alınan RNA fazının üzerine 0,5 ml izopropanol eklendi ve kuvvetli olmayan bir şekilde çalkalandıktan sonra 10 dakika inkübe edildi.
6. 12000 g'de +2°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpün tabanına yapışmış RNA pelleti üzerindeki süpernatant atıldı.
7. RNA pelletinin üzerine %75'lik etanol koyuldu ve vortexlenerek yıkandı.
8. 7500 g +8°C'de 5 dakika santfüj edildi.
9. Süpernatantı döküldü ve içinde kalan etanolün tamamen uçmasını sağlandı.
10. Tabana yapışmış olan RNA üzerine 50 µl RNA saklama sölüsyonu (RNAaz free water) eklendi.

3.5.2- Elde edilen total mRNA'lardan cDNA sentezi

Oluşan RNA süspansiyonlarının içeriğindeki RNA'ların miktarını belirlemek amacı ile Thermo Scientific Multiscan'da, Thermo Scientific µdrop Plate kullanılarak ölçümler yapıldı. Total RNA miktarları 25 µl'de 245 ng/ml olarak eşitlendi. Elde edilen total RNA'lardan Roche c-DNA sentez kiti (cat. No: 04.379012001) ile BIO-RAD Thermal Cyclers cihazı ile c-DNA sentez yöntemi ile cDNA' lar elde edildi.

cDNA prosedürü;

- | | | |
|----|---|--------|
| 1. | Total hacmi 245 ng/ml RNA'lardan | : 10µl |
| 2. | Anchored-Oligo(dT) ₁₈ primer | : 1µl |
| 3. | Random Hexamer primer | : 2µl |

4. Toplam hacim : 13 μ l
5. 10 dakika 65°C'de inkübe edildi ve buz üzerine alındı.
6. Komponent hazırlandı;
 Transkriptör Reverse Transcriptase Reaction Buffer : 4 μ l
 Protector RNase İnhibitör : 0,5 μ l
 Deoksinükleotid MİX : 2 μ l
 Transkriptör Reverse Transcriptase : 0,5 μ l
 Hazırlanan komponent 13 μ l olan örnek içerisine eklendi.
 Toplam volüm: 20 μ l oldu.
7. Hazırlanan örnekler santrifüj edildi ve örnekler cDNA sentezi için;
 10 dakika 25°C'de
 30 dakika 55°C'de
 5 dakika 85°C'de şartlarında inkübe edildi.

3.5.3 - Real-Time PCR protokolü

VİP, VPAC-1, VPAC-2 ve GAPDH mRNA düzeyleri, ROCHE Light Cyler Nano Instrument ile ölçüldü. Her örnek başına RT-PCR için hazırlanan karışım içeriği (Tablo 3.2);

Tablo 3.2: Real- Time PCR Karışım İçeriği

Karışım	Miktar
PCR- Grade su	4 μ l
Reconstituted primer(VİP, VPAC-1, VPAC-2, GAPDH)	1 μ
QPCR Master Mix	10 μ l
cDNA Örneği	5 μ l
Toplam hacim	20 μ l

Her primer için bu işlem ayrı olarak uygulandı ve RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Çalışmanın sonuçları LightCycler® Nano Software'den alınan CT değerleri ile $2^{-\Delta\Delta ct}$ relatif kuantifikasyon yöntemiyle değerlendirildi ve bütün değerler ilgili GAPDH değerleri ile normalize edildi ve sonuçlar ortalama \pm SEM olarak ifade edildi.

3.6- Western- Blot ile VİP ve reseptörleri olan VPAC-1 ve VPAC-2'nin Protein Miktar Tayini

Western-Blot tekniği, tüm beyaz ve kahverengi yağ dokusu ve saf beyaz ve kahverengi yağ dokusu adipositlerinden izole edilen toplam proteinlerin, hedef proteinler olan VİP, VPAC-1, VPAC-2 ve kontrol proteini olan β -Actin proteininin relatif rakamsal değerlerini tespit etmek için kullanıldı.

3.6.1-Toplam protein izolasyonu

Protein izolasyonu basamağının uygulanması sırasında içerisinde proteaz inhibitörü bulunan RIPA lizis solüsyonu (Tablo 3.3) kullanıldı.

Tablo 3.3: 1 ml RIPA lizis solüsyonu için karışım içeriği

Karışım	Miktar
Pmsf solüsyonu	10 µl
Sodyum solüsyonu	10 µl
Protein inhibitörü	20 µl
Ripa tampon	960 µl
Toplam hacim	1 ml

•Elimizde bulunan dokulara (elimizdeki dokuların ortalama ağırlıkları 0,09 gramdır ve RIPA Buffer miktarı bu ağırlığa göre hesaplanmıştır) 270 µl RIPA lizis solüsyonu eklendi.

- 45 dakika inkübe edildi.
- 5,400 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Protein içeriği olan süpernatantlar yeni tüplere aktarıldı ve protein miktar tayini için -20°C'de saklandı.

3.6.2- Protein miktar tayini

Protein miktar tayini Qubit Protein Assay kit kullanılarak, Qubit 2,0 Fluorometer cihazında yapıldı. Örnek ölçümü yapılamadan önce Qubit protein assay kit içerisinde bulunan standartlar ile cihazın optimizasyonu yapıldı.

Elimizde bulunan stok protein solüsyonları 1/20 oranında seyreltilerek, her bir örnek üzerine 199 µl Qubit protein assay solüsyonu (Tablo 3.4) eklenerek vortexlendi, 15 dakika inkübe edildi ve ölçüm yapıldı. Yapılan ölçüm sonrasında örnekler 100 µg'a eşitlendi.

Tablo 3.4: 200 µl Qubit protein assay solüsyonu için karışım içeriği

Karışım	Miktar
Qubit protein tampon	199 µl
Qubit protein reagent	1 µl
Toplam hacim	200 µl

3.6.3- Proteinlerin jele yüklenmesi için hazırlanması

- NuPage LDS sample buffer : 5 µl
 - NuPage Reducing agent : 2 µl
- 100 µg/ml protein içeren 13 µl protein süspansiyonuna eklendi. Toplam hacmi 20 µl olan karışım, ısıtıcı tabla üzerinde 70°C'de 10 dakika inkübe edildi ve proteinler jelde yürütülmek için hazır hale getirildi.

3.6.4- Jel elektroforezi (running)

Proteinleri yürütme işlemi Life Technologies Mini Gel tankta gerçekleştirildi. 4-12% Bis-Tris (1.5 mm) jel kaseti tanka yerleştirildikten sonra;

- İlk kuyucuğa protein standardı olan içerisinde 10 µl MagicMarc (Invitrogen/Life Technologies XP, 20-220 kDa aralığında), ve 5 µl SeeBlue Pre-stained (Invitrogen/Life Technologies XP, 3-198 kDa aralığında) yüklendi.

- Geriye kalan kuyucuklara yükleme işlemine hazır hale getirilmiş, 100 µg protein içeren 20µl örnek proteinler yüklendi.

- Örnekler 200 voltta 30 dakika yürütüldü.

3.6.5-Membrana transfer ve blotlama

İlk olarak işlemin gerçekleşeceği membran paketi (iBlot transfer stack) hazırlandı. Jel, jel kaseti içersinden dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve membran üzerine yerleştirildi. Hazırlanan membran paketi işlemin gerçekleştirileceği cihaza (iBlot 2 Dry Blotting System) yerleştirildi ve P3 programı seçilerek 7 dakika blotlama işlem uygulandı. Proteinlerin jelden membrana geçirilmesinden sonra membran bistüri ile 9cm*9cm boyutlarında kesilerek görüntüleme işlemi için hazır hale getirildi.

3.6.6- Bloklama

Bu basamakta iBind western sistemi (iBind card ve iBind cihazı) kullanıldı. iBİND solüsyonu (Tablo 3.5) hazırlandı ve bu solüsyon bloklama işlemi ve antikor muamelesinde kullanıldı.

Tablo 3.5: iBİND solüsyonu için karışım içeriği

Karışım	Miktar
Bind 5X solüsyonu	6 ml
iBind 100X additive	300 µl
Distile su	23,7 ml
Toplam hacim	30 ml

Antikorların hazırlanması:

- Primer antikor olan Beta-Actin 1/100 dilüsyonunda hazırlandı.
- Sekonder antikor olan Goat Anti-Mouse IgG, HRP conjugate 1/100 dilüsyonunda hazırlandı.

- iBind cihazına yerleştirilen iBind Card tüm yüzeyi ilk olarak 5 ml iBind solüsyonu, kartın tam ortası ise 1 ml iBind solüsyonu ile ıslatıldı.

- iBind solüsyonunda 5 dakika inkübe ettiğimiz membran, proteinlerin yüklendiği yüzün karta bakacak şekilde yerleştirilmesine dikkat edilerek yerleştirildi. iBind cihazının kapağı dikkatli bir şekilde kapatıldı. Cihazın üzerinde dört adet kuyucuk bulunmaktadır. Kuyucuklara sırası ile;

- 1. Kuyucuğa : 2 ml primer antikor,
 - 2. Kuyucuğa : 2 ml iBind solüsyonu,
 - 3. Kuyucuğa : 2 ml seconder antikor,
 - 4. kuyucuğa : 6 ml iBind solüsyonu
- Eklendi ve membran tüm gece boyunca inkübe edildi.

3.6.7- Görüntüleme

Görüntüleme işlemi için HRP (horse radish peroxidase) Konjugatlı Kemilüminesans boya (Novex ECL Chemiluminescent substrate reagent kit) kullanıldı.

HRP konjugatlı kemilüminesans boya hazırlanması:

- Reaktif A : 5 ml
- Reaktif B : 5 ml alındı.

Distile su içerisinde bekleyen membran ışık geçirmeyen bir kaba alındı ve üzerine A ve B reaktifler ilave edildi. Bir dakika inkübasyon sonrasında, membran görüntüleme cihazına yerleştirilip sırasıyla 1 dakika, 3 dakika, 5 dakika bekleme süreleriyle EI Logic 1500 İmaging System ile görüntüleme yapıldı. Sonuçlar Kodac Molecular İmaging Program ile değerlendirildi.

3.7- İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için GraphPad Prism6 programı kullanıldı. Sonuçlar, her grup için ortalama ve standart hata (ortalama \pm SEM) olarak sunuldu ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. VIP ve reseptörlerinin analiz edilen mRNA ve protein ifadelerinin karşılaştırılmalı istatistiksel analizleri için student's t-test kullanıldı.

4-SONUÇLAR

4.1- VİP ve Reseptörleri olan VPAC-1 ve VPAC-2'nin mRNA Ekspresyon Sonuçları

Elde edilen deri altı beyaz yağ ve interskapular aralık kahverengi yağ dokusundan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen VİP mRNA miktarı karşılaştırıldığında, kontrol grubu tüm beyaz yağ dokuda (kontrol-BYD) ve tüm kahverengi yağ dokuda (kontrol-KYD) VİP, VPAC-1 mRNA ekspresyonları mevcut olup, VPAC-2 mRNA ekspresyonu gözlenmemiştir. Soğuk stres uygulanan beyaz yağ dokusu (soğuk stres-BYD) ve soğuk stres uygulanan kahverengi yağ dokusu örneklerinde ise VİP, VPAC-1 ve VPAC-2 ekspresyonu gözlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Tüm yağ dokusunda GAPDH ile normalize edilen VİP, VPAC-1 ve VPAC-2 mRNA kat artış seviyeleri (ortalama±SEM) ve istatistiksel analiz sonuçları.

mRNA düzeylerinde kat artışı (GAPDH ile normalize edilen CT değerleri)			
GRUPLAR	VİP	VPAC-1	VPAC-2
Kontrol-BYD	1,007±0,055	1,010±0,064	-
Kontrol-KYD	0,979±0,303	0,468±0,067	-
Soğuk stres-BYD	36,96±8,489	0,001±0,0002	0,0112±0,0035
Soğuk stres-KYD	1,867±0,187	0,555±0,086	0,0032±0,0016

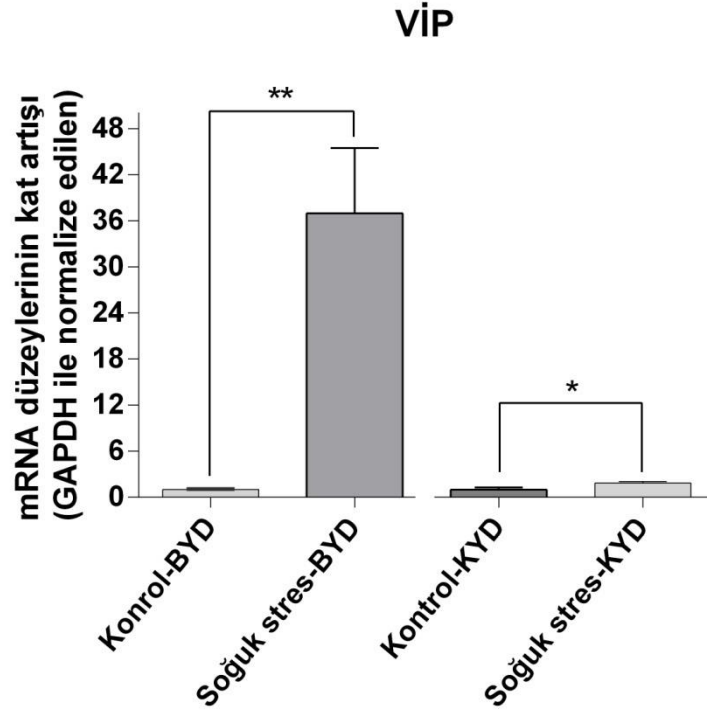
İzole edilmiş adipositlere bakıldığında ise kontrol-BYD, Kontrol-KYD, soğuk stres-BYD ve soğuk stres-KYD gruplarının adipositlerinde sadece VPAC-1 ekspresyonu gözlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Saf adipositlerde GAPDH ile normalize edilen VİP, VPAC-1 ve VPAC-2 mRNA kat artış seviyeleri (ortalama±SEM) ve istatistiksel analiz sonuçları.

mRNA düzeylerinde kat artışı(GAPDH ile normalize edilen CT değerleri)			
GRUPLAR	VİP	VPAC-1	VPAC-2
Kontrol-BYD	-	1,187±0,369	-
Kontrol-KYD	-	1,539±0,698	-
Soğuk stres-BYD	-	0,880±0,512	-
Soğuk stres-KYD	-	1,356±0,567	-

4.1.1- Tüm yağ dokusunda VİP mRNA ekspresyonu

BYD ve KYD'den izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen VİP mRNA miktarları karşılaştırıldı. Kontrol-BYD ve soğuk stres-BYD total mRNA'ları karşılaştırıldığında, soğuk stres ile BYD'de VİP ekspresyonunda anlamlı şekilde artış gözlenmiştir ($p<0.001$). Kontrol-KYD ile soğuk stres-KYD total mRNA'ları karşılaştırıldığında VİP ekspresyonunda anlamlı şekilde artış gözlenmiştir ($p<0.05$). (Şekil 4.1 ve Tablo 4.3).



Şekil 4.1: Tüm yağ dokusunda VİP mRNA İfade Profilleri.

Tüm BYD ve KYD'dan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen VİP mRNA miktarı (kat artışı). Kontrol gruplarında VİP gen ekspresyonu gözlenmiştir. Soğuk stres ile birlikte VİP gen ekspresyonu her iki grupta da artış göstermiştir (Değerler ortalama \pm SEM olarak ifade edildi, $n=8$, *,**= $p<0,05$).

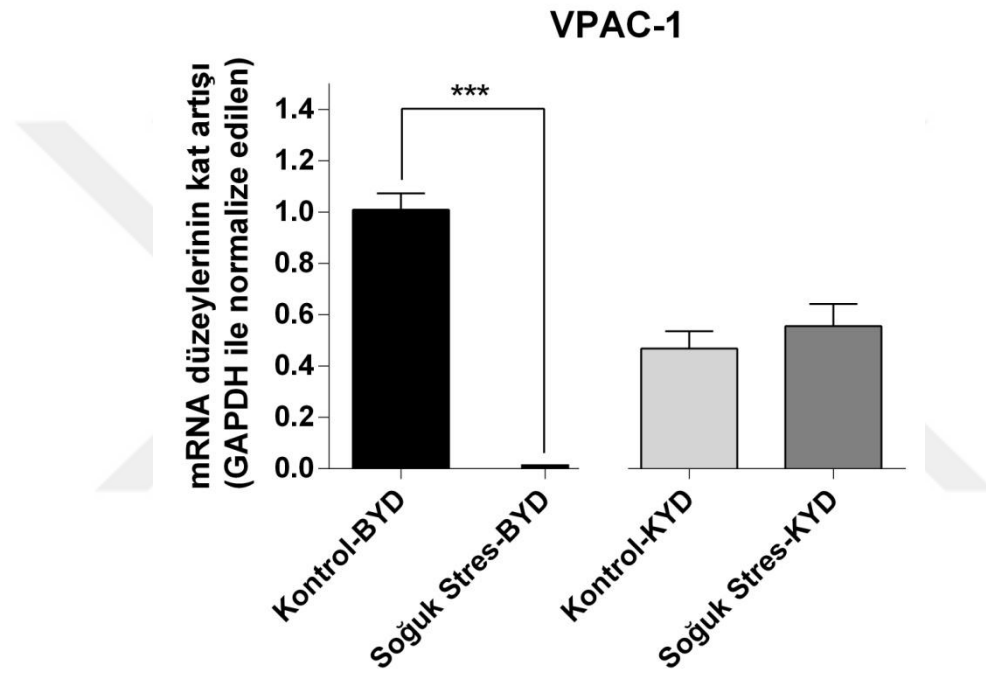
Tablo 4.3: Tüm yağ dokusunda VİP mRNA kat artışı.

BYD ve KYD dokularından elde edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen ve GAPDH ile normalize edilen VİP mRNA miktarı ve istatistiksel analiz sonuçları. "p" değerleri, grupların student's t-test ile karşılaştırılması sonucunda farkın anlamlılığını ifade etmektedir.

VİP mRNA düzeylerinde kat artışı (GAPDH ile normalize edilen)		
GRUPLAR	MEAN±SEM	P değerleri
Kontrol-BYD	1,007±0,055	P<0.05 (P=0.0035)
Soğuk stres-BYD	36,96±8,489	
Kontrol-KYD	0,979±0,303	P<0.05 (P=0.0260)
Soğuk stres-KYD	1,867±0,187	

4.1.2- Tüm yağ dokusunda VPAC-1 ekspresyonu

BYD ve KYD'den izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen VPAC-1 mRNA miktarları karşılaştırıldı. Kontrol-BYD ve soğuk stres-BYD'de VPAC-1 mRNA'ları karşılaştırıldığında, soğuk stres ile BYD'de VPAC-1 ekspresyonu anlamlı şekilde düşmüştür ($p < 0.001$). Kontrol-KYD ile soğuk stres-KYD VPAC-1 mRNA'ları karşılaştırıldığında ise soğuk stres ile birlikte KYD'da VPAC-1 ekspresyonunda artış gözlenmiştir ancak anlamlı şekilde farklılık göstermemektedir (Şekil 4.2 ve Tablo 4.4).



Şekil 4.2: Tüm Yağ dokusunda VPAC-1 mRNA İfade Profilleri.

Tüm BYD ve KYD'dan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen VPAC-1 mRNA miktarı (kat artışı). Kontrol gruplarında VPAC-1 gen ekspresyonu gözlenmiştir. Soğuk stres ile birlikte VPAC-1 gen ekspresyonu BYD'de azalırken, KYD'de anlamlı olmasa da artış göstermiştir (Değerler ortalama±SEM olarak ifade edildi, n=8, ***= $p < 0,001$).

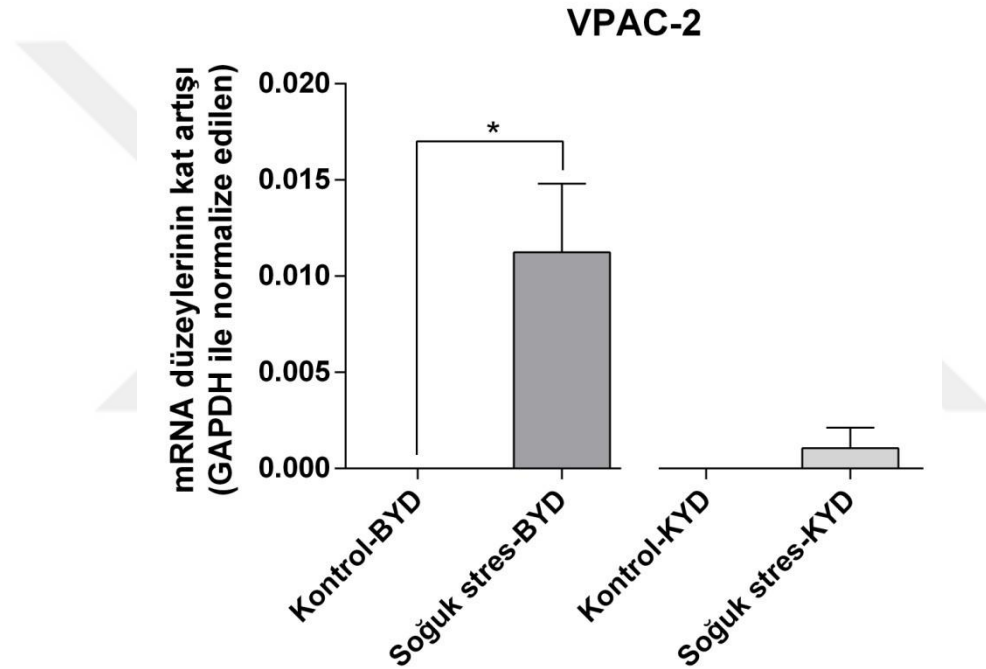
Tablo 4.4: Tüm yağ dokusunda VPAC-1 mRNA kat artışı.

BYD ve KYD dokularından elde edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen ve GAPDH ile normalize edilen VPAC-1 mRNA miktarı ve istatistiksel analiz sonuçları. "p" değerleri, grupların student's t-test ile karşılaştırılması sonucunda farkın anlamlılığını ifade etmektedir.

VPAC-1 mRNA düzeylerinde kat artışı (GAPDH ile normalize edilen)		
GRUPLAR	MEAN±SEM	P değerleri
Kontrol-BYD	1,010±0,064	P<0.001
Soğuk stres-BYD	0,001±0,0002	
Kontrol-KYD	0,468±0,067	P>0.05 (P=0.4386)
Soğuk stres-KYD	0,555±0,086	

4.1.3. Tüm yağ dokusunda VPAC-2 ekspresyonu

BYD ve KYD'den izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen VPAC-2 mRNA miktarları karşılaştırıldı. Kontrol gruplarında VPAC-2 ekspresyonu gözlenmemiştir ancak soğuk stres ile birlikte ekspresyonları gözlenmiştir. Kontrol-BYD ve soğuk stres-BYD'de VPAC-2 mRNA'ları karşılaştırıldığında, soğuk stres ile BYD'de VPAC-2 ekspresyonunda anlamlı şekilde artış gözlenmiştir ($p < 0.001$). Kontrol-KYD ile soğuk stres-KYD VPAC-2 mRNA'ları karşılaştırıldığında, soğuk stres ile birlikte KYD'da VPAC-2 ekspresyonunda artış gözlenmiştir ancak anlamlı şekilde farklılık göstermemektedir (Şekil 4.3 ve Tablo 4.5).



Şekil 4.3: Tüm Yağ dokusunda VPAC-2 mRNA İfade Profilleri.

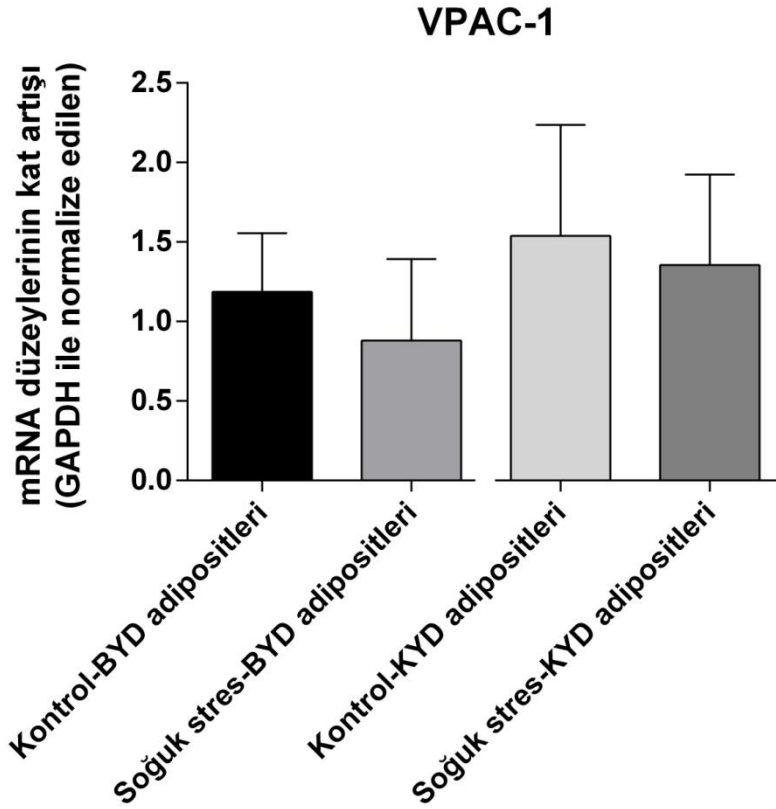
Tüm BYD ve KYD'dan izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen VPAC-2 mRNA miktarı (kat artışı). Kontrol gruplarında VPAC-2 gen ekspresyonu gözlenmemesine rağmen, soğuk stres ile birlikte VPAC-2 gen ekspresyonu gözlenmiştir (Değerler ortalama \pm SEM olarak ifade edildi, $n=8$, $*= p < 0,05$).

Tablo 4.5: Tüm yağ dokusunda VPAC-2 mRNA kat artışı. BYD ve KYD dokularından elde edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen ve GAPDH ile normalize edilen VPAC-2 mRNA miktarı ve istatistiksel analiz sonuçları. "p" değerleri, grupların student's t-test ile karşılaştırılması sonucunda farkın anlamlılığını ifade etmektedir.

VPAC-2 mRNA düzeylerinde kat artışı (GAPDH ile normalize edilen)		
GRUPLAR	MEAN±SEM	P değerleri
Kontrol-BYD	-	P<0.05 (P=0.0190)
Soğuk stres-BYD	0,0112±0,0035	
Kontrol-KYD	-	P>0.05 (P=0.4082)
Soğuk stres-KYD	0,0032±0,0016	

4.1.4- Adipositlerde VPAC-1 ekspresyonu

BYD ve KYD adipositlerinde yaptığımız çalışmalarda **sadece VPAC-1 geninin** eksprese olduğu gözlemlendi. BYD ve KYD'den izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen VPAC-1 mRNA miktarları karşılaştırıldı. Kontrol-BYD ve soğuk stres-BYD'de VPAC-1 mRNA'ları karşılaştırıldığında, soğuk stres ile BYD'de VPAC-1 mRNA ekspresyon miktarında düşüş gözlemlendi ancak anlamlı şekilde farklılık göstermemektedir. Kontrol-KYD ile soğuk stres-KYD VPAC-1 mRNA'ları karşılaştırıldığında, soğuk stres ile birlikte KYD'da VPAC-1 ekspresyonunda düşüş gözlemlenmiştir ancak anlamlı şekilde farklılık görülmemiştir (Şekil 4.4 ve Tablo 4.6).



Şekil 4.4: Saf adipositlerdeki VPAC-1 mRNA ifade profilleri.

BYD ve KYD saf adipositlerinden izole edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen VPAC-1 mRNA miktarı (kat artışı). Kontrol gruplarında VPAC-1 gen ekspresyonu gözlemlenmiştir ve soğuk stres ile birlikte VPAC-1 gen ekspresyonunda her iki grupta düşüş gözlemlenmiştir (Değerler ortalama±SEM olarak ifade edildi, n=8).

Tablo 4.6: Saf Adipositlerde VPAC-1 mRNA kat artışı.

BYD ve KYD saf adipositlerinden elde edilen total mRNA'lardan PCR tekniği ile ölçülen ve GAPDH ile normalize edilen VPAC-1 mRNA miktarı ve istatistiksel analiz sonuçları. "p" değerleri, grupların student's t-test ile karşılaştırılması sonucunda farkın anlamlılığını ifade etmektedir..

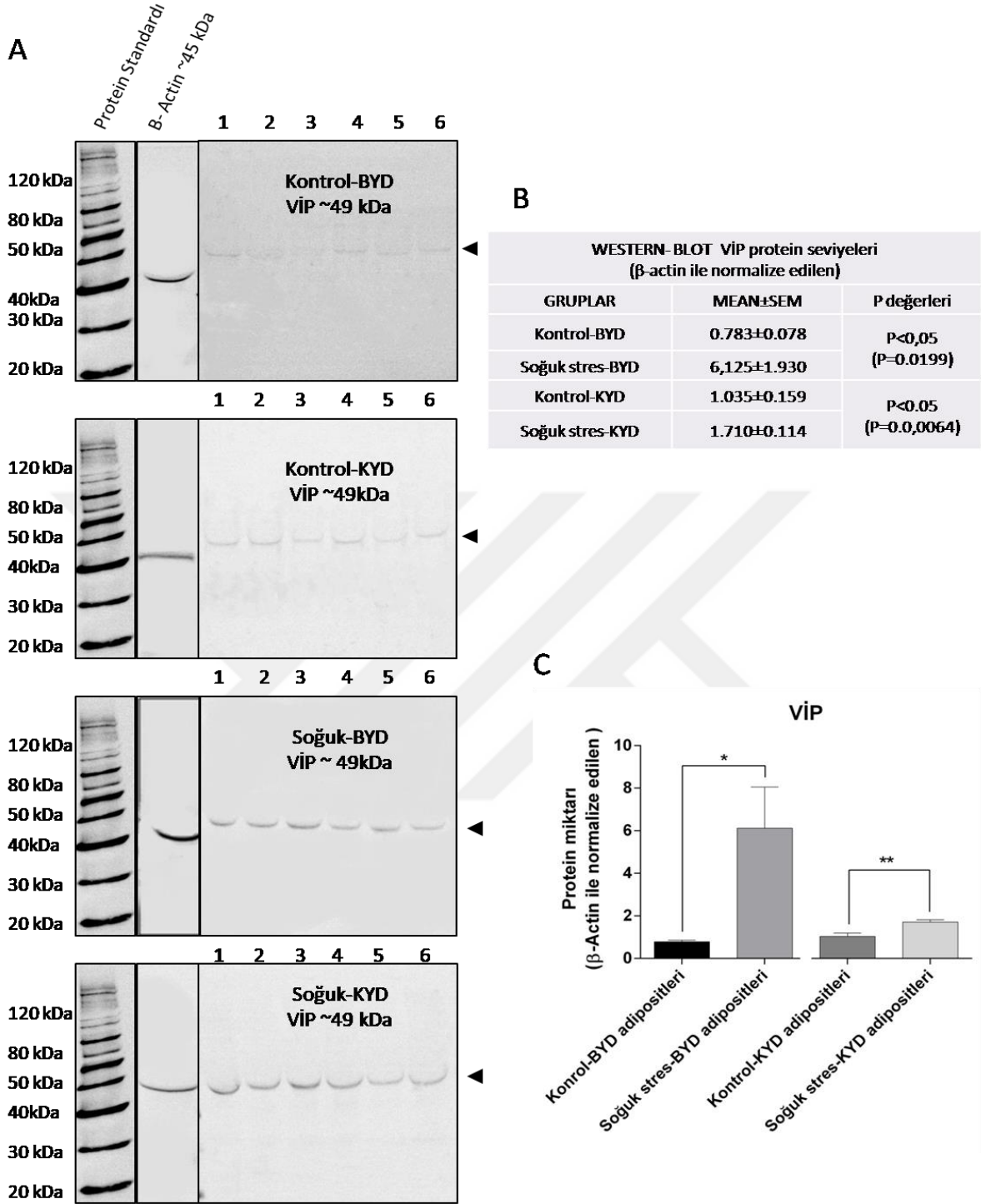
SAF ADİPOSİTLERDE VPAC-1 mRNA düzeylerinde kat artışı (GAPDH ile normalize edilen)		
GRUPLAR	MEAN±SEM	P değerleri
Kontrol-BYD	1,187±0,369	P>0.05
Soğuk stres-BYD	0,880±0,512	P=0.6385
Kontrol-KYD	1,539±0,698	P>0.05
Soğuk stres-KYD	1,356±0,567	P=0.8435

4.2- Western-Blot Sonuçları

4.2.1- Adipositlerde VİP protein miktarı

Beyaz ve kahverengi yağ dokusu adipositlerden izole edilen total proteinlerden, Western-Blot tekniği ile ölçülen total VİP protein miktarları karşılaştırıldı. Kontrol grubu beyaz yağ dokusu (kontrol-BYD) ve soğuk stres beyaz yağ dokusu (soğuk stres-BYD) adipositlerinde total VİP protein seviyeleri karşılaştırıldığında, soğuk stres ile birlikte total VİP protein seviyelerinde anlamlı şekilde artış gözlenmiştir ($P<0.05$). Kontrol grubu kahverengi yağ dokusu (kontrol-KYD) ve soğuk stres kahverengi yağ dokusu (soğuk stres-KYD) adipositlerinde ise total VİP protein seviyeleri karşılaştırıldığında anlamlı şekilde artış gözlenmiştir ($p<0.05$). (Şekil 4.5).





Şekil 4.5: VIP' in western-blot sonuçları.

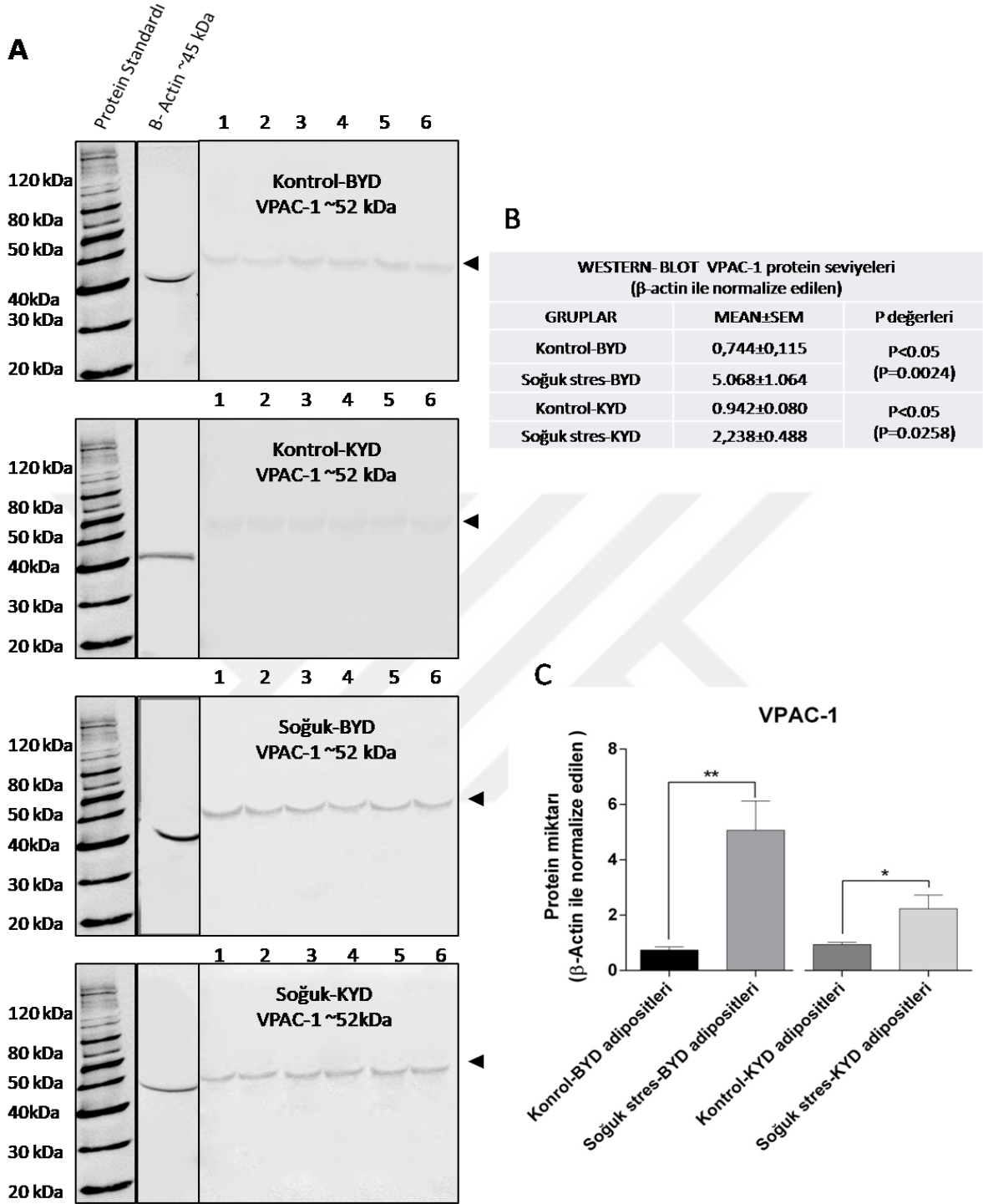
A- Western-blot ile çalışılan 49kDa VIP'in membran görüntüsü ile kontrol proteini olan 45 kDa β -actin'in membrandaki konumlarının karşılaştırılması. VIP'in kontrol BYD, kontrol KYD, soğuk stres BYD ve soğuk stres KYD gruplarında yapılan western blot çalışmasının membran fotoğrafları. **B-** Saf kontrol BYD ve KYD, saf soğuk stres BYD ve KYD adipositlerinden izole edilen proteinlerden Western-Blot tekniği ile ölçülen VIP'in gruplara göre protein miktarları. Tayin edilen miktarlar değerler ilgili β -Actin değerleri ile normalize edildi ve sonuçlar $x\pm$ SEM olarak ifade edildi, "p" değerleri, grupların hepsinin student's t-test ile karşılaştırılması sonucunda farkın anlamlılığını ifade etmektedir (n=6)

C- Saf kontrol BYD ve KYD, saf soğuk stres BYD ve KYD adipositlerinden izole edilen proteinlerden Western-Blot tekniği ile ölçülen VIP'in gruplara göre protein miktarlarının dağılımı. (*, ** = p<0.05, n=6).

4.2.2- Adipositlerde VPAC-1 protein miktarı

Beyaz ve kahverengi yağ dokusu adipositlerden izole edilen total proteinlerden, Western-Blot tekniği ile ölçülen total VPAC-1 protein miktarları karşılaştırıldı. Kontrol grubu beyaz yağ dokusu (kontrol-BYD) ve soğuk stres beyaz yağ dokusu (soğuk stres-BYD) adipositlerinde total VPAC-1 protein seviyeleri karşılaştırıldığında, soğuk stres ile birlikte total VPAC-1 protein seviyelerinde anlamlı şekilde artış gözlenmiştir ($P<0.05$). Kontrol grubu kahverengi yağ dokusu (kontrol-KYD) ve soğuk stres kahverengi yağ dokusu (soğuk stres-KYD) adipositlerinde total VPAC-1 protein seviyeleri karşılaştırıldığında anlamlı şekilde artış gözlenmiştir ($P<0.05$) (Şekil 4.6).





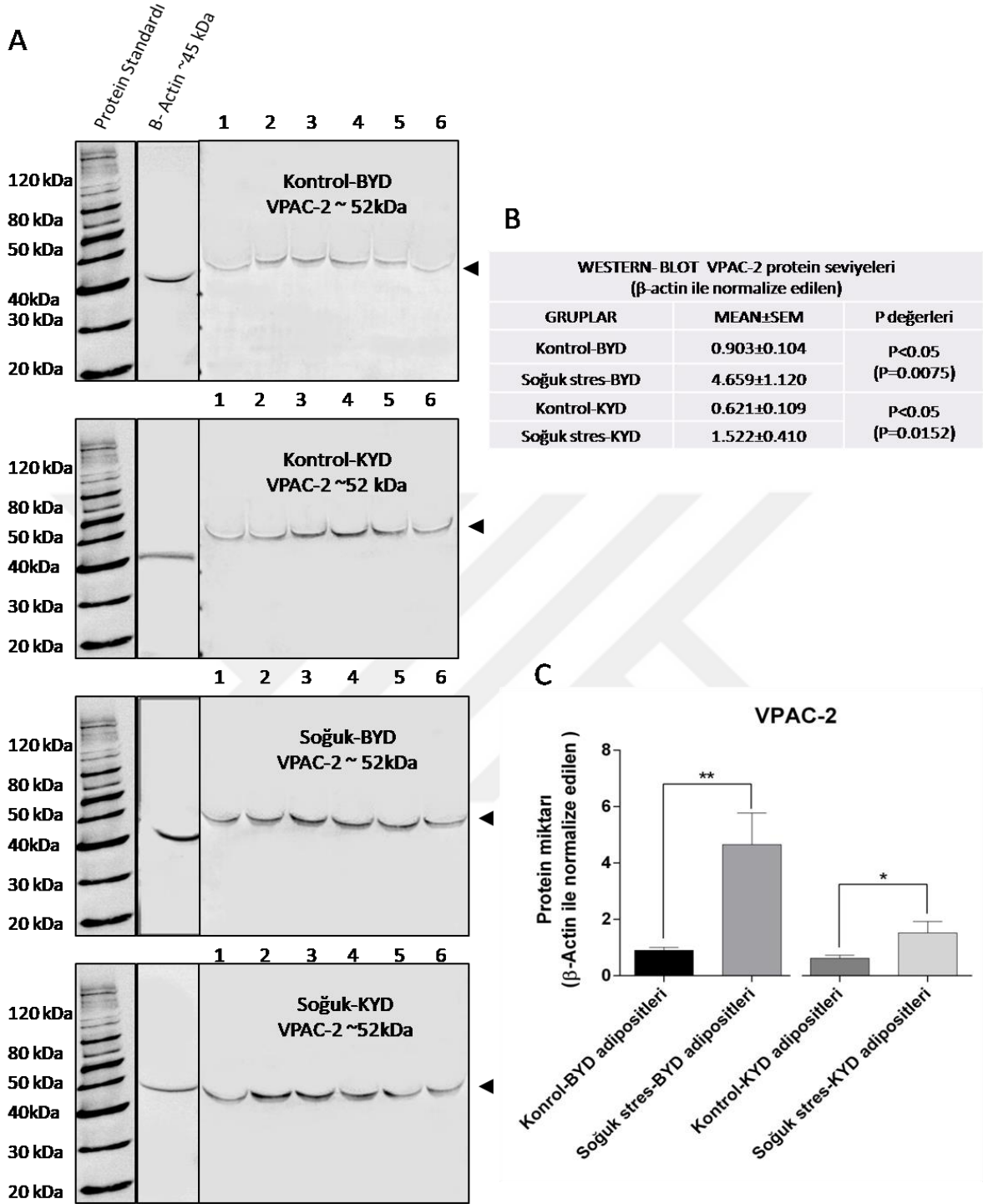
Şekil 4.6: VPAC-1'in western-blot sonuçları.

A- Western-blot ile çalışılan 52 kDa VPAC-1'in membran görüntüsü ile kontrol proteini olan 45 kDa β -actin'in membrandaki konumlarının karşılaştırılması. VPAC-1'in kontrol BYD, kontrol KYD, soğuk stres BYD ve soğuk stres KYD gruplarında yapılan western blot çalışmasının membran fotoğrafları. **B-** Saf kontrol BYD ve KYD, saf soğuk stres BYD ve KYD adipositlerinden izole edilen proteinlerden Western-Blot tekniği ile ölçülen VPAC-1'in gruplara göre protein miktarları. Tayin edilen miktarlar değerler ilgili β -Actin değerleri ile normalize edildi ve sonuçlar $x\pm$ SEM olarak ifade edildi, "p" değerleri, grupların hepsinin student's t-test ile karşılaştırılması sonucunda farkın anlamlılığını ifade etmektedir (n=6). **B-** Saf kontrol BYD ve KYD, saf soğuk stres BYD ve KYD adipositlerinden izole edilen proteinlerden Western-Blot tekniği ile ölçülen VPAC-1'in gruplara göre protein miktarlarının dağılımı (**, * = p<0.05, n=6).

4.2.3- Adipositlerde VPAC-2 protein miktarı

Beyaz ve kahverengi yağ dokusu adipositlerinden izole edilen total proteinlerden, Western-Blot tekniği ile ölçülen total VPAC-2 protein miktarları karşılaştırıldı. Kontrol grubu beyaz yağ dokusu (kontrol-BYD) ve soğuk stres beyaz yağ dokusu (soğuk stres-BYD) adipositlerinde total VPAC-2 protein seviyeleri karşılaştırıldığında, soğuk stres ile birlikte total VPAC-2 protein seviyelerinde anlamlı şekilde artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Kontrol grubu kahverengi yağ dokusu (kontrol-KYD) ve soğuk stres kahverengi yağ dokusu (soğuk stres-KYD) adipositlerinde ise total VPAC-2 protein seviyeleri karşılaştırıldığında ise anlamlı şekilde artış gözlenmiştir ($P<0.05$) (Şekil 4.7).





Şekil 4.7: VPAC-2'in western-blot sonuçları.

A- Western-blot ile çalışılan 52 kDa VPAC-1'in membran görüntüsü ile kontrol proteini olan 45 kDa β -actin'in membrandaki konumlarının karşılaştırılması. VPAC-2'in kontrol BYD, kontrol KYD, soğuk stres BYD ve soğuk stres KYD gruplarında yapılan western blot çalışmasının membran fotoğrafları. **B-** Saf kontrol BYD ve KYD, saf soğuk stres BYD ve KYD adipositlerinden izole edilen proteinlerden Western-Blot tekniği ile ölçülen VPAC-2'in gruplara göre protein miktarları. Tayin edilen miktarlar değerler ilgili β -Actin değerleri ile normalize edildi ve sonuçlar $x\pm$ SEM olarak ifade edildi, "p" değerleri, grupların hepsinin student's t-test ile karşılaştırılması sonucunda farkın anlamlılığını ifade etmektedir (n=6). **C-** Saf kontrol BYD ve KYD, saf soğuk stres BYD ve KYD adipositlerinden izole edilen proteinlerden Western-Blot tekniği ile ölçülen VPAC-2'nin gruplara göre protein miktarlarının dağılımı (**,* = p<0.05, n=6).

5- TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında amacımız, normal şartlar altındaki sıçanların beyaz ve kahverengi yağ dokularında ve adipositlerinde VİP ve reseptörleri VPAC-1 ve VPAC-2'nin varlığının araştırılması ve soğuk stres koşullarında nasıl değiştiğinin incelenmesidir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre tüm (adipositler ve civar dokular) beyaz ve kahverengi yağ dokusunda VİP ve VPAC-1 gen ekspresyonu mevcut olup VPAC-2 gen ekspresyonu gözlenmemiştir. Ancak soğuk stres uygulanması ile birlikte VİP ve VPAC-2 ekspresyonu kahverengi ve beyaz yağ dokusunda artarken, VPAC-1 ekspresyonunun beyaz yağ dokusunda azaldığı, kahverengi yağ dokusunda ise arttığı gözlenmiştir. Sadece adipositlerde (çevre dokulardan izole edilmiş) ise yalnızca VPAC-1 ekspresyonu bulunmuş, VİP ve VPAC-2 ekspresyonu gözlenmemiştir. Ancak soğuk stres ile birlikte her iki grupta da VPAC-1 ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. Beyaz ve kahverengi yağ doku adipositlerinde yapılan protein tespit çalışmaları sonucunda hem beyaz hem de kahverengi adipositlerde sadece VPAC-1 ekspresyonu olmasına rağmen VİP, VPAC-1 ve VPAC-2 proteinleri tespit edilmiş ve protein miktarlarının soğuk stres ile birlikte arttığı gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular ile VİP ve reseptörleri VPAC-1 ve VPAC-2'nin yağ dokusu ve adipositlerde gen ekspresyonu ve protein miktarlarının soğuk stres ile birlikte nasıl değiştiği ilk defa gösterilmiş olup, VİP ve reseptörlerinin, soğuk strese adaptasyon sırasında yağ dokusu regülasyonuna katılıyor olabileceğine işaret etmektedir.

Vücuttaki enerjinin büyük bir kısmı trigliseritler şeklinde yağ dokusunda depolanır. Soğuğa maruziyet ile sempatik sinir sisteminin uyarılması sonucunda noradrenerjik lifler kahverengi yağ dokusu adipositleri üzerindeki etkilerini arttırmaları. Böylelikle hormon duyarlı lipaz aktive olur ve lipoliz sonucunda açığa çıkan yağ asitleri aracılığı ile kahverengi yağ dokusu adiposit mitokondilerinde bulunan UCP-1'de termojenez için ATP yerine ısı üretilir (Shimizu, Mori, 2005). VİP ve VİP ile yüksek homolojide olup ayrıca VPAC-1/VPAC-2 reseptörlerine aynı oranda afinite gösteren PACAP (Arimura, 1982) ile yapılan çalışmalar, VİP ile yağ dokusu metabolizması üzerindeki olası ilişkiyi işaret etmektedir. Fransen ve arkadaşlarının adipositlerle yaptığı bir çalışmada VİP lipolizi arttırmasına rağmen (Fransen vd., 1973), yapılan başka bir çalışmada ise VİP'in bu etkisi yalnızca fizyolojik dozun üstündeki konsantrasyonlarda görülmüştür (Hauner vd., 1988). Epididimal yağ dokusundan izole edilen adipositlerde ise VİP ve PACAP'ın lipolize aracılık ettiği belirtilmiştir (Akesson vd., 2003, Akesson vd., 2005). Ayrıca Tomkin ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise obez hastalarda rapor edilen yüksek serum VİP ile trigliserit seviyesi arasındaki pozitif korelasyon, VİP'in yağ metabolizması üzerine etkili olabileceğini göstermektedir (Tomkin vd., 1982). Yukarıdaki çalışmalarda VİP'in yağ dokusunda lipolizi arttıran etkilerine işaret edilmektedir. Tüm bilgiler ışığında bizim elde ettiğimiz bulgulara bakıldığında soğuk stres tüm kahverengi yağ dokusunda VİP'in

mRNA ekspresyon seviyelerini arttırmakla birlikte, mRNA ekspresyonu olmaksızın adipositlerde de VİP protein seviyelerinde artışa sebep olmuştur ve VİP'in soğuk stres sırasında kahverengi yağ dokusunda termojenez için lipolize aracılık edebileceğine işaret etmektedir.

Yapılan çalışmalarda PACAP'ın termojenez, enerji depolarının mobilizasyonu, enerji metabolizması ve açlık sırasında otonom sinir sistemi aracılığı ile metabolizma üzerinde düzenleyici rolü olabileceği gösterilmiştir (Rudecki ve 2016, Resch vd., 2011, Resch vd., 2013). PACAP'ın termojenezin merkezi regülasyonundaki rolü ilk olarak 1995 yılında Masuo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, reserpin (norepinefrini bloke eder) kaynaklı vücut ısısı düşük farelerin lateral ventrikülüne PACAP enjeksiyonu ile vücut ısısını düzenlediği öngörülmüş ancak VİP'in enjeksiyonu ile böyle bir etki gözlemlenmemiştir. Ayrıca PACAP geninin elimine edildiği (PACAP^{-/-}) farelerin, soğuk karşısında termojenik süreçleri indüklemeye yeteneklerinde net olarak bozulma olduğu ve vahşi tip farelere oranla daha düşük vücut ısısına sahip oldukları, ayrıca soğuğa adaptasyon sırasında β 3-adrenoreseptör ilişkili olarak termojenezi regüle edemedikleri gösterilmiştir (Masuo vd. 1995, Banki vd., 2014, Diane vd., 2014). Tanida ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada ise hipotalamik PACAP, hem enerji ihtiyaçlarına hem de soğuk strese yanıt olarak yağ dokusu depolarını uyaran sempatik sinir aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Tanida vd., 2010). Ayrıca intrasrebroventriküler olarak uygulanan VİP'in, arteriyel kan basıncı ve tansiyonu yükselttiği, kahverengi yağ dokusu ile sağlanan termojenezi aktive ettiği ve hipertermi oluşturduğu gösterilmiştir (Shido, Yoneda ve Nagasaka, 1989). Tunçel ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka çalışmalarda ise VİP, midede soğuk stres ile oluşturan ülser gelişimini ve mast hücre degranülasyonunu engellemiş ve mide dokusunu lipid peroksidasyonundan korumuş (Tunçel, Erkasap, Şahintürk, Doğruyol-Ak, Tunçel, 1998), ayrıca soğuğa maruz bırakılan sıçanlarda damarların norepinefrine verdiği yanıtı arttırmıştır (Tuncel vd. 1996). Yukarıdaki çalışmalarda, soğuğa adaptasyon sırasında VİP ve PACAP'ın yağ dokusu üzerinde aracılık ettiği sempatik sinir aktivitesine işaret edilmektedir. Bizim çalışmamızdaki bulgulara göre soğuk stres uygulanması sonucunda VİP, VPAC-2 gen ekspresyonlarının beyaz yağ dokusunda anlamlı bir artış göstermesi, ayrıca adipositlerde VİP, VPAC-1 ve VPAC-2 protein seviyelerindeki anlamlı artış; VİP'in soğuk stres uygulanması sonucunda sempatik sinir aktivitesini arttırarak, yağ dokusundaki protermojenik etkisini VPAC-2 ve VPAC-1 reseptörü aracılığı ile sağlıyor olabileceğini göstermektedir.

Soğuğa maruziyet, yağ üretimini sağlamak ve termojenik özellikleri uyarmak için diğer organları ve yağ dokusunda bulunan farklı hücre tiplerini de etkilemektedir. Örneğin soğuğa maruziyet yağ dağılımını ve ısı değişimini kolaylaştırmak için kan damarlarının dağılımını arttırmakla birlikte (Baron, vd., 2012) katekolamin üretmek üzere kahverengi yağ dokusundaki makrofajları aktive eder (Nguyen, vd., 2011). Ayrıca karaciğer, kahverengi yağ dokusu ve damarlardan fibroblast büyüme

faktörü-21 (Konishi vd., 2000); kastan irisin (Wu vd., 2012) ve tiroidlerden T4 hormonunun (Bianco, 2011) salgılanmasını uyarır. Bu moleküller kahverengi yağ dokusunda UCP-1 ekspresyonunu ve aktivitesini arttırmak için işlev görürler. Kahverengi yağ dokusu aynı zamanda otokrin olarak termojenik fonksiyonunu arttıran kemik morfogenetik protein-8B (Whittle vd., 2012) ve endotel büyüme faktörü de (Lu, vd., 2012) üretir. Bizim elde ettiğimiz bulgular da VIP ve VPAC-2'nin adipositlerde ekspresyonu olmaksızın proteinlerinin gözlemlenmesi, VIP'in yağ dokusunda bulunan kan damarları ve makrofajlar aracılığı ile soğuğa maruziyette termojeneze otokrin olarak aracılık edebileceğinin ayrıca dolaşım ile yağ dokusuna gelerek dışarıdan da etkili olabileceğine işaret etmektedir.

Soğuğa maruziyet sırasında vücudun farklı bölümlerinde (özellikle inter-skapular bölgede), beyaz yağ dokusu kahverengi yağ dokusuna dönüşerek vücut ısısının regülasyonunu sağlamaya yardımcı olur (Cinti, 2012). Bu dönüşüm sırasında ara form olarak oluşan bej yağ adipositleri UCP-1 protein yönünden zengin adipositlerdir ve termojeneze aracılık ederler. Harms ve Seale'nin yapmış olduğu bir çalışmada bej adipositlerin, kemirgenlerde önemli bir subkutan deposu olan inguinal beyaz yağ dokusunda en fazla buldukları gösterilmiştir. Bununla birlikte, UCP-1 ifade eden adipositlerin, soğuğa maruz kalmaya tepki olarak beyaz yağ dokusu depolarının çoğunda arttığına işaret edilmiştir (Harms ve Seale, 2013). Yapılan başka bir çalışmada ise soğuğa maruziyet ile uyarılan beyaz yağ dokusunda kahverengi adipositlerin ortaya çıkmasının ağırlıklı olarak β 3-adrenoseptör aracılı farklılaşmayı işaret ettiği belirtilmiştir (Barbatelli vd., 2010). Bizim elde ettiğimiz sonuçlar beyaz yağ dokusundaki VIP'in anlamlı artışının bu dönüşümden sorumlu olabileceğine işaret etmektedir ve bu bulguların aydınlatılması için β 3-adrenoseptör ile VIP'in beyaz yağ dokusundaki ilişkisinin detaylı olarak çalışılması gerekmektedir. Ayrıca hayvanlardaki kimyasal ısı üretimi dokularındaki kahverengi yağ miktarı ile doğru orantılıdır (Guyton, Hall, 2007, s. 871). Isı üretimini tetikleyen soğuk stresin süresi, kahverengi yağ dokusundaki VIP, VPAC-1 ve VPAC-2 protein artışını etkileyebileceğine işaret etmektedir. Bizim sonuçlarımız, VIP'in soğuk stres ve yağ dokusu arasındaki etkileşim hakkında literatür boşluğunun doldurulması bakımından katkı sağlayacaktır.

Yağ dokusu üzerinde etkili olan insülin, hormon duyarlı lipazı baskılayarak trigliseritlerin parçalanmasını engeller ve depolanmasını arttırarak yağ dokusunda hacimce artışa neden olur. Ayrıca yağ dokusu kapiller duvarında yer alan lipoprotein lipazı da aktive ederek yağ asitlerinin yağ hücrelerine emilimi gerçekleştirir ve trigliseritlere dönüştürülerek depo edilmesini de sağlar. VIP ve PACAP ile yapılan çalışmalar, VIP'in insülin üretimini arttırıcı etkilerine işaret etmektedir. Ahren ve Lundquist'in fareler ile yaptığı çalışmada VIP'in intravenöz enjeksiyonunun, glikozun insülin sekresyonunu arttıran etkisini potansiyelize ettiğini göstermiştir (Ahren ve Lundquist, 1981). Ayrıca

fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada, PACAP'ın doza bağımlı olarak insülin sekresyonunu uyardığı ancak glikozun etkisini değiştirmeden insülin duyarlılığını inhibe ettiği gösterilmiştir (Filipson vd., 1998). Adiposit hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada ise, PACAP'ın adipositlerde insülin ile uyarılan fosfotidilinisitol-3'ün aracılık ettiği insülin kaynaklı glikoz alımını arttırdığı ve aynı zamanda adipositlerde insülin etkisini kuvvetlendirdiği gösterilmiştir (Nakata vd. 1998). Ayrıca Akesson ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada , PACAP insülin varlığında lipogenezi, insülin yokluğunda ise lipolizi arttırıcı etki göstererek insüline bağımlı bir etki göstermiştir (Akesson vd., 2003). Yukarıdaki çalışmalar VİP'in insülin salgılanması üzerindeki pozitif etkisini göstermektedir ve böylelikle VİP yağ depolanmasını arttırıcı etkisi yağ dokusunda hacimce artış sağlayarak, soğuğa karşı adaptasyonda ısı yalıtımı ile vücut sıcaklığının korunmasında etkili oluyor olabilir. Bizim çalışmamızda ise VİP'in tüm beyaz yağ dokusundaki gen ekspresyon seviyeleri ve izole edilen adipositlerindeki protein seviyelerinde, soğuk stres uygulanması ile birlikte göstermiş olduğu anlamlı artış bu bilgileri destekler niteliktedir.

Soğuk stresin besin alımını arttırması, metabolizma hızını yükseltmesi ve ısı yalıtkanlığı için yağ dokusunda hacimce artış sağlaması, hipotalamustaki sıcaklık düzenleyici sistem (preoptik ve anterior hipotalamik alan) ile besin alımını düzenleyen sistem (perifornikal, lateral, ventromediyal çekirdek) arasındaki etkileşimden kaynaklanır. Bu nedenle soğuğa karşı adaptasyonda beslenmenin önemli bir görevi bulunmaktadır (Guyton, Hall, 2007, s.871). Yağ dokusundan salıverilen leptin, hipotalamusta arkuat çekirdekte bulunan reseptörlerine bağlanarak gıda alımını engeller ve sempatik sinir aktivitesini stimüle ederek lipolizi hızlandırır (Shen, Tanida, Nijima, Nagai, 2007, Kalil ve Haynes, 2012, Tanida vd., 2013). Ayrıca leptinin kahverengi yağ dokusunda da sempatik sinir sistemi aktivitesini arttırarak UCP-1 aracılığı ile vücut ısısı düzenlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Haynes vd. 1997). Hawke ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ventromedial hipotalamik çekirdekte bulunan PACAP'ın, leptinin iştah baskılanması ve enerji harcanması etkilerine aracılık ettiği ve leptinin enjeksiyonu ile artan vücut sıcaklığının PACAP enjeksiyonu ile de arttığı ayrıca leptinin intra-serebroventriküler enjeksiyonunun, ventromedial hipotalamustaki PACAP mRNA ekspresyonunu arttırdığı da gösterilmiştir (Hawke vd., 2009). Sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada ise PACAP reseptör antagonistlerinin intra-serebroventriküler enjeksiyonunun, leptinin beyaz yağ dokusu üzerinde sağlamış olduğu sempatik sinir aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Tanida vd., 2013). VİP'in elimine edildiği fareler ile yapılan bir çalışmada ise, zayıf vücut fenotipi ve azalmış yağ kütlesi ile birlikte plazmada artan leptin seviyeleri gözlemlenmiştir (Vu vd., 2015), bunun aksi durumu ise VPAC-2 elimine edilmiş farelerde gösterilmiştir (Asnicar vd., 2002). Ayrıca Baranowska ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, obezlerde açlık durumunda plazma VİP konsantrasyonunun çok düşük olduğu ve anekroksiya nervoza hastalarında ise daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Baranowska vd.,

2000). Tüm bu çalışmalar, VİP ve VPAC-2'nin yağ dokusundan salıverilen leptinin olası etkilerine aracılık edebileceğini göstermektedir. Bizim bulgularımız ele alındığında ise beyaz ve kahverengi adipositlerde ekspresyonu olmaksızın soğuk stres ile birlikte ortaya çıkan VİP ve VPAC-2 protein seviyelerinin; yağ dokusu adipositlerinden salıverilen leptin aracılığı ile soğuk stres sonucunda hem hipotalamus üzerinden hem de yağ dokusunda bulunan reseptörleri aracılığı ile termojenez için yağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesine aracılık ediyor olabileceğini göstermektedir.

VİP'in yağ dokusunda soğuk stres sonucunda hangi reseptörü üzerinden işlev gösterdiğini belirten çalışmalar sınırlıdır. Nishimoto ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, soğuk ile oluşturulan beyin hasarlarında, VPAC-2'nin reaktif astrositler içerisinde belirli günlerdeki geçici ekspresyonu ve fonksiyonel glutamat taşıyıcılarının artan regülasyonu, soğuğa maruziyet ile oluşturulan nörolojik bozukluklarda VİP/VPAC-2 sisteminin eksitotoksisiteye karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (Nishimoto, Miyakawa, Wada, Furuta, 2011). Yapılan başka bir çalışmada ise VİP'in lipoliz etkilerine VPAC-2 reseptörünün aracılık ettiği gösterilmiştir (Akesson vd., 2015). Yaptığımız literatür araştırmalarında VPAC-1'in yağ dokusu metabolizması üzerine gösterdiği etkilere değinilmemiştir. Bizim çalışmamızda ise VPAC-1'in tüm beyaz yağ dokusunda azalan, kahverengi yağ dokusunda artan mRNA ekspresyonu ve adipositlerde artan protein seviyesi soğuk stres sonucunda VİP'in kahverengi yağ dokusu üzerindeki etkilerine VPAC-1 reseptörünün de aracılık edebileceğini göstermektedir.

6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, yaptığımız çalışmada soğuk strese maruziyet sonrasında VİP ve reseptörleri ile beyaz ve kahverengi yağ dokusu metabolizması arasındaki etkileşimi araştırdık. Bu etkileşim: kahverengi yağ dokusunda termojenez için VPAC-1 reseptörü ile de lipolize aracılık etmek, soğuğa karşı adaptasyonda hem sempatik sinir aktivitesinin arttırmak hem de beyaz ve kahverengi yağ dokusunda protermojenik etki göstermek; soğuk stres ile beyaz yağ dokusunun kahverengi yağ dokusuna dönüşümünü sağlamak; VİP'in insülin salgılanmasının üzerine olan pozitif etkisi ile yağ depolanmasını arttırarak, yağ dokusundan salınan leptin aracılığı ile soğuk stres sonucunda hem hipotalamus üzerinden hem de adipositlerde bulunan reseptörleri aracılığı ile yağ dokusu metabolizması üzerine pozitif etki göstermek gibi farklı mekanizmalarla gerçekleşiyor olabilir. Bizim bulgularımız VİP ve reseptörlerine spesifik olarak ilk defa gösterilmiş olup vücut ısısının düzenlenmesinde VİP ve reseptörlerinin etkili olabileceğini desteklemektedir. Ancak bu düzenlemenin hangi mekanizma/mekanizmalar aracılığı ile yapıldığının aydınlatılması için ilave çalışmalar gerekmektedir.

6- KAYNAKLAR DİZİNİ

Adamou, J.E., Aiyar, N., Van-Horn, S.V. (1995). *Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor*. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:385–392.

Agarwal, A., Halvorson, L.M., Legradi, G. (2005). *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: Evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene*. *Molecular Brain Research Volume 138, Issue 1, 29 July 2005, Pages 45–57*<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.03.016>

Akesson, I., Ahré, B., Edgren, G., Degerman, A. (2005). *VPAC2-R Mediates the lipolytic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide in primary rat adipocytes*. *Endocrinology*, 02/2005; 146(2):744-50.

Asnicar, M.,A., Köster, A., Heiman, M.,L., Tinsley, F., Smith, D.,P., Galpreath, E., Fox, N., Ma, Y., L., Blum, W., F., HHsiung, H., M. (2002) *Vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 2 deficiency in mice results in growth retardation and increased basal metabolic rate*. *Endocrinology* 143(10):3994–4006

Angel, F., Go, V.L., Schmalz, P.F., Szurszewski, J.H. (1983). *Vasoactive intestinal polypeptide: A putative transmitter in the canine gastric muscularis mucosa*. *J. Physiol.* 341: 641,1983. 130.

Arimura A. (1982). *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): Discovery and current status of research*. *Reg Peptides* 1992; 37: 287-303.

Awad, A.B., Bradford, P.G. (2010). *Adipose tissue and inflammation*. Baskı no: 978-1-4200-9130-4. U.S. Taylor and Francis Group.

Baranowska, B., Radzikowska, M., Wasilewska-Dziubinska, E., Roguski, K., Borowiec, M. (2000). *Disturbed release of gastrointestinal peptides in anorexia nervosa*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2, 99–103.

Banki, E., Pakai, E., Gaszner, B., Zsiboras, C., Czett, A., Bhuddi, P.R.P., Hashimoto, H., Toth, G., Tamas, A., Reglodi, D., Garami, D. (2014). *Characterization of the thermoregulatory response to pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in rodents*. *J. Mol. Neurosci.* 54, 543–554 DOI: 10.1007/s12031-014-0361-0

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Baron, D.,M., Clerte, M., Brouckaert, P., Raheer, M.,J., Flynn, A.,W., Zhang, H., Carter, E.,A., Picard, M.,H., Bloch, K.,D., Buys, E.,S. (2012). *In vivo noninvasive characterization of brown adipose tissue blood flow by contrast ultrasound in mice*. *Circ Cardiovasc Imaging* 5: 652–659.

Bartelt, A. and Heeren, J. (2014). *Adipose tissue browning and metabolic health*. *Nature Reviews Endocrinology* 24–36, doi:10.1038/nrendo.2013.204

Berry D. C., Stenesen, D., Zeve, D. & Jonathan M. Graff, J. G. (2013). *The developmental origins of adipose tissue*. *Development* 140, 3939-3949 (2013) DOI:10.1242/dev.080549

Bianco, A.,C. (2011). *Minireview: Cracking the metabolic code for thyroid hormone signaling*. *Endocrinology* 152: 3306–3311

Cannon, B. & Nedergaard, J. (2004). *Brown adipose tissue: function and physiological significance*. *Physiol. Rev.* 84, 277–359

Caro, J. F., Sinha, M.K., Kolaczynski, J. W., Zhang, P. L., Considine, R. V. (1996). *Leptin: The tale of an obesity gene*. *Diabetes* 1996;45:1455-62

Cinti, S. (2012). *The Adipose organ at glance*. *Dis Model Mech.* 2012 Sep; 5(5): 588–594.

Cinti, S. (1999). *Adipose tissue and obesity*. *Ital J Anat Embryol* 1999;104:37–51.(4)

Colwell, C.S., Michel, S., Itri, J., Rodriguez, W., Tam, J., Lelievre, V., Hu, Z., Liu, X., & Waschek, J. A. (2017). *Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice*. 10.220.33.6 on March 9, 2017

Dartt, D. A., Baker, A. K., Vaillant, C., Rose, P. E. (1984). *Vasoactive intestinal polypeptide stimulation of protein secretion from rat lacrimal gland acini*. *Am. J. Physiol.* 247: G502, 1984.

David J. Flint, D. F., Roger A. Clegg, R. A., Richard G. Vernon, R. G. (1981). *Prolactin and the regulation of adipose-tissue metabolism during lactation in rats*. *Molecular and Cellular Endocrinology* Volume 22, Issue 2, Pages 265–275 [http://dx.doi.org/10.1016/0303-7207\(81\)90096-4](http://dx.doi.org/10.1016/0303-7207(81)90096-4)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

De Matteis, R., Ricquier, D., Cinti, S. L. J. (1998). *TH-, NYP-, SP-, and CGRP- immunoreactive nerves in interscapular brown adipose tissue of adult rats acclimated at different temperatures: an immunohistochemical study.* J Neurocytol 1998;27(12):877–886

Delgado, M., Adap, C., Martinez, C., Juarranz M.G., Arranz, A., Gomariz, R.P., Leceta, J. (2002). *Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases.* J Mol Med (2002) 80:16–24

DOI: 10.1007/s00109-001-0291-5.

Dickinson, T., Fleetwood-Walker, S. M., Mitchell, R. , Lutz, E. M. (1997). *Evidence for roles of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptors in modulating the responses of rat dorsal horn neurons to sensory inputs.* Neuropeptides , 31 (2), 175-185

Diane, A., Nikolic, N., Rudecki, A., P., King, M., S., Bowie, J., D., and Gray, S., L.(2014). *PACAP is essential for the adaptive thermogenic response of brown adipose tissue to cold exposure.* Journal of Endocrinology (2014) 222, 327–339.

Dunmore, S. J. & Brown, J. E .P. (2013). *The role of adipokines in β -cell failure of type 2 diabetes.* Journal of Endocrinology 216, T37–T45.
DOI: 10.1530/JOE-12-0278

Falsetti, L., Zanagnola, V., Gastaldi, A., Memo, M., Missalle, C., Spano, P. F. (1988). *Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) selectively stimulates prolactin release in healthy women.* Gynecological Endocrinology, 2(1), 11-18. DOI: 10.3109/09513598809029335

Fantuzzi, G. (2005). *Adipose tissue, adipokines, and inflammation.* Allergy Clin Immunol 2005;115:911-9. DOI:10.1016/j.jaci.2005.02.023

Fantuzzi, G., Mazzone, T. (2007). *Adipose tissue and adipokines in health and disease.* 1-59745-370-6. Amerika: Humana Press Inc.

Felíu, J.E., Mojena, M. Silvestre, R.A, Monge, L., Marco, J. (1983). *Stimulatory Effect of Vasoactive Intestinal Peptide on Glycogenolysis and Gluconeogenesis in Isolated Rat Hepatocytes: Antagonism by Insulin.* Endocrinology(1983)112(6):2120-2127.
DOI:<https://doi.org/10.1210/endo-112-6-2120>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Frandsen, E.K., Moody, A.J. (1973). *Lipolytic action of a newly isolated vasoactive intestinal polypeptide*. Horm Metab Res 5:196-199.

Giachetti, A., Said, S.I., Reynolds, R. C., Koniges F. C. (1977). *Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in brain: localization in, and release from isolated nerve terminals*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3424, 1977.

Gibson, A., Tucker, J.F. (1982). *The effects of vasoactive intestinal polypeptide and of adenosine 5'-triphosphate on the isolated anococcygeus muscle of the mouse*. Br. J. Pharmacol. 77: 97, 1982.

Giordano, A., Frontini, A., Murano, I. (2005). *Regional-dependent increase of sympathetic innervation in rat white adipose tissue during prolonged fasting*. J Histochem Cytochem 2005;53:679-687.

Gomariz R.P., Lorenzo M.J., Cacicedo L., Vicente A., Zapata A. (1990). *Demonstration of immunoreactive vasoactive intestinal peptide (IR-VIP) and somatostatin (IR-SOM) in rat thymus*. Brain Behav Immun 4:151-161

Goyal, R. K., Rattan, S., Said, S. I. (1980). *VIP as a possible neurotransmitter of non-cholinergic non-adrenergic inhibitory neurones*. Nature 288: 278, 1980. 126.

Gozes, I., Fridkin, M., Hill, J.M. (1999). *Pharmaceutical VIP: prospects and problems*. Curr Med Chem 1999;6:1019-1034.

Grider, J.R., Cable, M. B., Said, S.I., Makhlof, G.M. (1985). *Vasoactive intestinal peptide (VIP) as neural mediator of gastric relaxation*. Am. J. Physiol. 248: G73, 1985. 127.

Grider, J.R., Cable, M.B., Bitar, K.N., Said, S.I., Makhlof G.M. (1985). *Vasoactive intestinal peptide: Relaxant neurotransmitter in tenia coli of the guinea pig*. Gastroenterology 89: 36, 1985. 128.

Harmar, A.J., Arimura, A., Gozes, I., Journot, L., Laburthe, M., Pisegna, J.R., Rawlings, S., R., Robberecht, P., Said, S.I., Sreedharan, S. P., Wank, S.A. & Waschek, J.A. (1998). *International union of pharmacology. XVIII. nomenclature of receptors for vasoactive peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*, Pharmacol Rev. Jun;50(2):265-70.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Hauer, H., Glatting, G., Kaminska D., & Pfeiffer E. F. (1988). *Effect of Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) on Glucose and Lipid Metabolism of Isolated Rat Adipocytes* Res Exp Med (1988) 188:189-195

Hawke, Z., Ivanov, T.,R., Bechtold, D.,A., Dhillon, H., Lowell, B.,B., Luckman, S.,M. (2009). *PACAP neurons in the hypothalamic ventromedial nucleus are targets of central leptin signaling.* J Neurosci 29:14828–14835.

Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K., Nagata, S. (1992). *Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide.* [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90101-I](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90101-I)

İbrahim, M.M. (2010). *Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Structural and Functional Differences.* Obesity Reviews 11: 11-18.

Johansson, O., Lundberg, J. M. (1981). *Ultrastructural localization of VIP-like immunoreactivity in large dense-core vesicles of "cholinergic-type" nerve terminals in cat exocrine glands.* Neuroscience 6: 847, 1981.

Kalil, Z., K. and Haynes, W., G. (2012). *Sympathetic nervous system in obesity-related hypertension: mechanisms and clinical implications.* Hypertension Research (2012) 35, 4–16.

Konishi, M., Mikami, T., Yamasaki, M., Miyake, A., Itoh, N. (2000). *Fibroblast growth factor-16 is a growth factor for embryonic brown adipocytes.* J Biol Chem 275: 12119–12122.

Laburthe M., Couvineau, A. (2002). *Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP.* Regulatory Peptides 108, 165– 173. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-0115\(02\)00099-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-0115(02)00099-X)

Laburthe, M., Couvineau, A., Marie, J. C. (2002). *VPAC receptors for VIP and PACAP.* Receptors Channels 2002;8:137–53.

Laburthe, M., Couvineau, A., Tan, V. (2007). *Class II G protein coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology.* Peptides 28 1631–1639.

Lu, X., Ji, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, S., An, Y., Liu, P., Zheng, Y. (2012). *Resistance to obesity by repression of VEGF gene expression through induction of brown-like adipocyte differentiation.* Endocrinology 153: 3123–3132.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Lundberg, J.M., Anggard, A., Fahrenkrug, J. (1981). *Complementary role of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and acetylcholine for cat submandibular gland blood flow and secretion. II. Effects of cholinergic antagonists and VIP antiserum.* Acta Physiol. Scand. 113: 329, 1981.

Luo, X., Zeng, W., Xu, X., Popov, S., Davigno, I., Wilkie, T.M., Mumby, S. M., and Muallem, S. (1999). *Alternate coupling of receptors to Gs and Gi in pancreatic and submandibular gland cells.* J. Biol. Chem., 274 (1999), pp. 17684–17690. DOI: 10.1074/jbc.274.25.17684.

Lutz, E.M., Sheward, W.J., West, K.M., Morrow, J.A., Fink, G., Harmar, A.J. (1993). *The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide.* Volume 334, number 1, 3-8, Federation of European Biochemical Societies 00145793/93/\$6.00

Masuo, Y., Noguchi, j., Morita, S., Matsumoto, Y. (1995). *Effects of intracerebroventricular administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on the motor activity and reserpine-induced hypothermia in murines.* Brain Research, Vol 700(1-2), 219-226. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00978-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(95)00978-Y)

Matsuzaki, Y., Hamasaki, Y., Said, S. I. (1985). *Vasoactive intestinal peptide: A possible transmitter of non-adrenergic relaxation of guinea pig airways.* Science 210: 1252, 19i10. 129.

Matsuda, K., Maruyamaa, K., Nakamachi T., Miura, T., Uchiyamaa, M. & Shioda, S. (2005). *Inhibitory effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on food intake in the goldfish, Carassius auratus.* Peptides 26 (2005) 1611–1616. DOI:10.1016/j.peptides.2005.02.022

Miyata, A, Jiang, L, Dahl, R .D. (1990). *Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide with 38 residues (PACAP-38).* Biochem Biophys Res Commun 1990; 170: 643-648.

Miyata, A., Sato, K., Hino, J. (1998). *Rat aortic smooth muscle cell proliferation is bidirectionally regulated in a cell cycle-dependent manner via PACAP/VIP type 2 receptor.* Ann NY Acad Sci 1998;865:73–81

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Murthy, K.S., Teng, B. Q., Jin, J.G. And Makhlof, G.M. (2017). *G protein-dependent activation of smooth muscle eNOS via natriuretic peptide clearance receptor.* <http://ajpcell.physiology.org/> by 10.220.32.247

Nathanson, I., Widdicombe, J.H., Barnes, P. J. (1983). *Effect of vasoactive intestinal peptide on ion transport across dog tracheal epithelium.* J. Appl. Physiol. 55: 1844, 1983.

Nussdorfer, G.G., Malendowicz, L.K. (1998). *Role of VIP, PACAP, and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis.* Peptides 1998;19:1443-1467.

Nguyen, K., D., Qiu, Y., Cui, X., Goh, Y.,P., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.,M., Chawla, A. (2011). *Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis.* Nature 480: 104-108.

O'Doriso, M.S, Wood, C.L, O'Doriso, T.M. (1985). *Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide modulation of the immune response.* J. Immunol. 135: 792s, 1985.

Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., Walsh, K., (2011). *Adipokines in inflammation and metabolic disease.* Nature Reviews Immunology 11, 85-97 doi:10.1038/nri2921.

Paoluzi, O.A., Rossi, P., Montesano, C., Bernardi, S., Carnieri, E., Marchione, O.P., Nardi, F., Lacopini, F., Pica, R., and Paoluz, P. (2001). *Discrepancy between polymerase chain reaction assay and western blot analysis in the assessment of caga status in dyspeptic patients.* Blackwell Science Ltd, Helicobacter, 6, 130-135.

Petkov, V., Mosgoeller, W., Ziesche, R., Raderer, M., Stiebellehner, M., Vonbank, K., Funk, G.C., Hamilton, G., Novotny, C., Burian, B., & Block, L. H. (2003). *Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension.* J. Clin. Invest. 111:1339-1346 (2003). DOI:10.1172/JCI200317500.

Rola-Pleszczynski, M., Bolduc, D., St.-Pierre, S. (1985). *The effects of vasoactive intestinal peptide on human natural killer cell function.* J. Immunol. 135: 2569, 1985.

Said, S.I., & Mutt, V. (1970). *Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine.* Science 169, 1217-1218.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Said, S.I. & Rosenberg, R.N. (1976). *Vasoactive intestinal polypeptide: abundant immunoreactivity in neural cell lines and normal nervous tissues*. Science 192: 907, 1976.

Said, S.I. (1985). *Peptides, endothelium and pulmonary vascular reactivity*. Chest 88: 207S, 1985.

Sanlioglu, A.D., Karacay, B., Balci M.K. , Griffith, T. S. & Sanlioglu, S. (2012). *Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes*. Journal of Molecular Endocrinology (2012) 49, R157–R167.
DOI: 10.1530/JME-12-0156

Sawangjaroen, K., Cuurlewis, J.D. (1994). *Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) and Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) on Prolactin, Luteinizing Hormone and Growth Hormone Secretion in the Ewe*. Journal of Neuroendocrinology, Vol.6 549-555 DOI: 10.1111/j.1365-2826.1994.tb00618.x

Schaffler, A., Ehling, A., Neumann, E., Herfarth, H., Tarner, I., Scholmerich, J. (2003). *Adipocytokines in synovial fluid*. JAMA 2003;290:1709-10.

Schling, P., Löffler, G. (2002). *Cross talk between adipose tissue cell, impact on pathophysiology*. News Physiol Sci 2002; 17:99-104.

Shen , J., Tanida, M., Niijima, A., Nagai, K. (2007). *In vivo effects of leptin on autonomic nerve activity and lipolysis in rats*. Neuroscience Letters 416 (2007) 193–197.

Shido, O., Yoneda, Y. and Nagasaka, T. (1989). *Changes in brown adipose tissue metabolism following intraventricular vasoactive intestinal peptide and other gastrointestinal peptides in rats*. Japanese Journal of Physiology, 39, 359-369, 1989.

Shimizu, H., Mori, M. (2005) *The brain- adipose axis: A review of involvement of molecules*, Nutritional Neuroscience [2005, 8(1):7-20]

Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Huang, J. X. (1993). *Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor*. Biochem Biophys Res Commun 1993;193:546–553.

Steppan, C.M., Lazar M.A. (2002) *Resistin and obesity- associated insulin resistance*. Tren Endoc& Metab 2002;13:18-23

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Stein, D.T., Esser, V., Stevenson, B.E., Lane, K.E., Whiteside, J. H., Daniels, M.B., Chen, S., McGarry, J.D. (1996). *Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat*. J Clin Invest 97:2728–2735.

Suzuki, Y., McMaster, D., Huang, M., Lederis, K., Rorstad O.P. (1985). *Characterization of functional receptors for vasoactive intestinal peptide in bovine cerebral arteries*. J. Neurochem. 45: 890, 1985.

Sylvia, P.P., Dorothy, B.H., Gary, J. H. (2010). *The development and endocrine functions of adipose tissue*. Mol Cell Endocrinol 323: 20-34.

Tang, B., Young, X., Xie, R., Li, Q., Yang, S. (2014). *Vasoactive intestinal peptide receptor-based imaging and treatment of tumors*. DOI: 10.3892/ijo.2014.2276

Tanida, M., Shintani, N., Tsukiyama, N., Hatanaka, M., Hashimoto, H., Sawai, H., Baba, A., Nagai, K. (2010). *Regulation of autonomic nerve activities by central pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*. Regul. Pept. 161, 73–80. doi: 10.1016/j.regpep.2010.02.002.

Tanida, M., Hayata, A., Shintani, N., Yamamoto, N., Kurata, Y., Shibamoto, T., Morgan, D.A., Rahmouni, K. & Hashimoto, H. (2013) *Central PACAP mediates the sympathetic effects of leptin in a tissue-specific manner*. Neuroscience 23,297 – 304 <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.016>

Tomkin, G.H., Ardill, J., Lafferty, H., Darragh, A. (1982) *Vasoactive intestinal polypeptide in obesity*. Int J Obesity 7 : 153-160.

Tunçel, N., Gürer, F., Aral, E., Uzuner, K., Aydın, Y. and Bayçu, C. (1996). *The effect of vasoactive intestinal peptide (vip) on mast cell invasion/degranulation in testicular interstitium of immobilized + cold stressed and p-endorphin-treated rats*. Peptides, Vol. 17, No. 5, pp. 817-824, 1996

Tunçel, N., Erkasap, N., Şahintürk, V., Doğruyol-Ak, D. And Tunçel, M. (1998). *The protective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on stress-induced gastric ulceration in rats*. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb11191.x

Töre, F., Tunçel, N. (2007). *Protein pieces of adipose tissue secretory puzzle*. Biomedical Reviews; 18: 27-43

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Usdin, T.B., Bonner, T.I., Mezey, E. (1994) *Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions*. *Endocrinology* 1994;135:2662–2680.

Villarroya, J., Cereijo, R., & Villarroya, F. (2013). *An endocrine role for brown adipose tissue? Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: E567–E572. DOI:10.1152/ajpendo.00250.2013.

Vu, J. P., Larauche, M., Flores, M., Luong, L., Norris, J., Oh, S., Liang, L., Waschek, J., Pisegna, J.R., Germano, P. M. (2015). *Regulation of Appetite, Body Composition, and Metabolic Hormones by Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP)*. *J Mol Neurosci* (2015) 56:377–387
DOI 10.1007/s12031-015-0556-z

Xiao X., Wu, H., Zhou, X., Xu, S., He, J., Shen, W., Zhou, G., and Huang, M. (2012). *The combination of quantitative pcr and western blot detecting cp4-epsps component in roundup ready soy plant tissues and commercial soy-related foodstuffs*. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02718.x. Vol. 77, Nr. 6, 2012 _ *Journal of Food Science*

Wei, Y., Mojsov, S. (1996). *Tissue specific expression of different human receptor types for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide: Implications for their role in vasoactive intestinal peptide (VIP) gene in a human tumor*. *Peptides human physiology*. *J Neuroendocrin* 1996;8:811–817.

Willis, E., Ottesen, B., Wagner, G., Sundler, F., Fahrenkrug, J. (1988). *Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) as a possible neurotransmitter involved in penile erection*. *Acta Physiol. Scand.* 113: 545, 1

Whittle, A.,J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vazquez, M.,J., Morgan, D., Csikasz, R.,I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S. (2012). *BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions*. *Cell* 149: 871–885.

Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L.,M., Ye, L., Choi, J.,H., Giang, A.,H., Khandekar, M., Virtanen, K.,A., Nuutila, P., Schaart, G. (2012). *Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human*. *Cell* 150: 366–37

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Nagai, R., Kimura, S., Tomita, M., Froguel, P., Kadowaki, T.(2001)*The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity*. *Nat Med.* 2001 Aug;7(8):941-6.

EK – 1

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Bahar DEMİRBAŞ

Doğum tarihi ve yeri: 21.01.1990 İZMİR/ Konak

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresleri: 05309052819/ bahar.dmrbs@gmail.com

Eğitim Durumu

Çiğli Çifte Havuzlar İlköğretim Okulu (1997-2002)

Karşıyaka Türkbirliği İlköğretim Okulu (2002-2005)

Karşıyaka Emlakbank Süleyman Demirel Süper Lisesi (İngilizce hazırlık, 2005-2008)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2009-2013)

Mesleki Deneyim: Yok

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

Yayınlar:

Ayhanci, A., Tekin, Y., Uyar, R., Sahitürk, V., Musmul, A., Ertekin, R., Gunes, S., Cetik, S., Eyiis, E., Demirkaya, M., Piyale, M., Demirbas, B., Can, I. (2012). *Protective Effect of Carvacrol in Cyclophosphamide Induced Oxidative Injury in Rat Testis*. The American Society for Cell Biology. December 15-19, San Francisco, CA, USA

Korkmaz, O., T., Oncu-Kaya E, M., Arkan, S., Akdere, O., Demirbaş, B., Kilicdogan, C., Karson, A., Ates, N., Tuncce, N. 2015. *Absence Epilepsy: The Effects of VIP Application on Somatosensorial Cortex of WAG/Rij Rats*. 12th International Symposium On VIP, PACAP and Related Peptides, Kapadokta, TÜRKİYE.

Korkmaz, OT., T., Demirbas, B., Saydam, F., Degirmenci, İ., Chaldakov, G., Tuncel, N. 2016. *Alteration of VIP, PACAP and VPAC-2 Gene Expression In Brown And White Adipose Tissues Of The Rats During Cold Exposure*, RegPep, July 12-14, Rouen-Normandy, Franse

Bilimsel Etkinlikler:

Burslar :

Ödüller :

Projeler : Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı "Bazı Antiepileptik İlaçların ve Metabolitlerinin Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometri ile Tayini" başlıklı, 1301S009 nolu bilimsel proje, 15.06.2013-12.12.2015.

Sözlü Konferans veya Seminerler :

Kurslar ve Eğitim Programları : biyolojik örneklerde protein tespit çalıştayı, CURIB, Mont-Saint-Aignan, 11.07.2016

Almış olduğum sertifika programı, Likit Kromatografisi- Kütle Spektrometresi (LCMS) cihazında, biyolojik örneklerde protein tespiti ve miktar tayini ve method geliştirme eğitimini içeren bir program olmakla beraber cihaz tanıtımı da yapılmıştır.

Pedagojik Formasyon Sertifikası, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım sertifikası.

