

**TC  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ADRENOMEDULLİN VE RESVERATROL VERİLEN SIÇANLARIN  
KAHVERENGİ VE BEYAZ YAĞ DOKULARINDA ANJİOGENİK  
FAKTÖRLER VE SİRTUİN GEN İFADESİNİN OBEZİTE OLGUSUNDA  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**AYŞE ASİYE CULUM**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MALATYA  
OCAK 2018**

Tezin Başlığı: **Adrenomedullin ve resveratrol verilen sıçanların kahverengi ve beyaz yağ dokularında anjiogenik faktörler ve sirtuin gen ifadesinin obezite olgusunda karşılaştırılması**

Tezi Hazırlayan: **Ayşe Asiye CULUM**

Sınav Tarihi: 15 Ocak 2018

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

### **Sınav Jüri Üyeleri**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ** .....  
İnönü Üniversitesi

**Prof. Dr. Mehmet Doğan GÜLKAÇ**.....  
Kocaeli Üniversitesi

**Prof. Dr. Dilek ASMA** .....  
İnönü Üniversitesi

**Doç. Dr. Nuran CIKCIKOĞLU YILDIRIM**.....  
Munzur Üniversitesi

**Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN** .....  
İnönü Üniversitesi

**Prof. Dr. Halil İbrahim ADIGÜZEL**  
Enstitü Müdürü

## **ONUR SÖZÜ**

Doktora Tezi olarak sunduğum “Adrenomedullin ve resveratrol verilen sıçanların kahverengi ve beyaz yağ dokularında anjiogenik faktörler ve sirtuin gen ifadesinin obezite olgusunda karşılaştırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Ayşe Asiye CULUM

## ÖZET

Doktora Tezi

### ADRENOMEDULLİN VE RESVERATROL VERİLEN SIÇANLARIN KAHVERENGİ VE BEYAZ YAĞ DOKULARINDA ANJİOGENİK FAKTÖRLER VE SİRTUİN GEN İFADESİNİN OBEZİTE OLGUSUNDA KARŞILAŞTIRILMASI

Ayşe Asiye CULUM

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

134 + x Sayfa

2018

Danışman: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ

Obezite, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimine bağlı olarak ortaya çıkan kompleks, kronik bir hastalıktır. Adipoz dokuda olduğu gibi, pek çok anjiogenik faktör dokuların beslenmesinde yeni damarın meydana gelmesini sağlar. Adrenomedullin (AdM) ise anjiogenik özelliklere sahip bir peptiddir. Resveratrol Sirtuin 1 (*SIRT1*) geninin aktive edilmesinde etkili bir moleküldür. *SIRT1* geni enerji metabolizmasını düzenlemede rol oynar.

Obez sıçanlarda resveratrolün *SIRT1* gen ifadesi üzerine etkileri, kahverengi ve beyaz yağ dokularındaki önemi nedeniyle vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'ndeki değişimler ve AdM'in etkileri araştırıldı. Sıçanlar 8 gruba ayrıldı. Obez gruplar %60 enerji olarak yağ içeriğine sahip yüksek yağ diyetiyle 3 ay boyunca beslendi. Obezite sağlandıktan sonra AdM ve resveratrol uygulama gruplarına gün aşırı bir kez, 4 hafta süreyle 2.5 nmol/kg AdM ve 10 mg/kg resveratrol intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Kahverengi ve beyaz yağ dokusundaki AdM, *SIRT1* ve VEGF mRNA seviyeleri semi-kantitatif PZR ile; protein seviyeleri ise Western Blot yöntemi ile saptandı.

Beyaz ve kahverengi yağ dokusu uygulamalara farklı yanıtlar vermiştir. Ayrıca obez ve kontrol grupları AdM ve resveratrol uygulamalarına farklı yanıtlar vermiştir. Beyaz adipoz dokuda *SIRT1* ifadesi resveratrolle artmıştır. Kahverengi yağ dokusunda AdM'in tek başına ifadeyi artırma üzerine etkisi yoktur, fakat resveratrolle uygulandığında kontrol gruplarında ifade daha artmıştır. AdM ile resveratrol uygulaması iki molekülün ayrı ayrı uygulanmasından tamamen farklı yanıtlar ortaya çıkarmıştır. Sonuçlar AdM'in *SIRT1* protein seviyelerini arttırabileceğini ve resveratrolün anjiogeneizde rolü olabileceğini göstermektedir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Obezite, VEGF, adrenomedullin, resveratrol, kahverengi yağ doku, beyaz yağ doku, *SIRT1*, yüksek yağ diyeti.

## ABSTRACT

Doctorate Thesis

### THE COMPARISON OF ANGIOGENIC FACTORS AND EXPRESSION OF SIRTUIN GENE IN BROWN AND WHITE ADIPOSE TISSUES OF RATS TREATED WITH ADRENOMEDULLIN AND RESVERATROL IN OBESITY

Ayşe Asiye CULUM

Inonu University  
Institute of Science  
Department of Biology

134 + x Pages

2018

Supervisor: Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ

Obesity is a complex, chronic disease which arises according to the interaction between genetic and environmental factors. Many angiogenic factors provide formation of new vessels for the nourishment of tissues as in adipose tissue. Adrenomedullin (AdM) is also a peptide that has angiogenic features. Resveratrol is a molecule which is effective in the activation of sirtuin 1 (*SIRT1*) gene. *SIRT1* gene has a regulatory effect on energy metabolism.

The effects of resveratrol over *SIRT1* gene expression, the variations of vascular endothelial growth factor (VEGF) due to their importance in development of brown and white adipose tissue, and effects of AdM were investigated. Rats were divided into 8 groups. Obese groups were fed with high fat diet which has 60% fat content as energy for 3 months. After providing obesity, 2.5 nmol/kg AdM and 10 mg/kg resveratrol were treated to experimet groups intraperitonally (i.p.) every other day for 4 weeks. *AdM*, *SIRT1* and *VEGF* mRNA levels in brown and white adipose tissues were detected with semi-quantitative PCR; protein levels were detected with Western Blotting.

White and brown adipose tissue groups have responded differently to the treatments. Furthermore, obese and control groups have resposed differently to AdM and resveratrol treatments. *SIRT1* expression has increased with resveratrol in white adipose tissue. AdM has no effect alone over the increase of expression, but the the expression has increased when treated with resveratrol. The treatment of AdM with resveratrol has revealed completely diverse responses than the treatment of these two molecules apart. The results have showed that AdM could have ability to increase *SIRT1* protein levels, and resveratrol would have a role in angiogenesis.

**KEYWORDS:** obesity, VEGF, adrenomedullin, resveratrol, brown adipose tissue, white adipose tissue, *SIRT1*, high fat diet

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteklerini esirgemeyen danışmanım İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ'ye,

Çalışmanın yürütülmesinde proje desteğinden dolayı İnönü Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (proje no: 2016/153),

Yardım ve desteklerinden dolayı Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim Halil YILDIRIM ve İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Seval CİNG YILDIRIM'a,

Tezimin eksik malzemelerini cömertçe paylaşan İnönü Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Burhan ATEŞ'e,

Bana karşılık gözetmeden resveratrol temin eden ve sıçanlarda obezite sağlanması konusunda engin bilgilerini esirgemeyen değerli bilim insanı Fırat Üniversitesi Hayvan Beslenme ve Beslenme Hastalıkları Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Kazım ŞAHİN'e,

Western Blot örneklerimi görüntüleme imkanı sağlayan Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Sevgi İRTEGÜN KANDEMİR ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ'ye,

Çalışmalarım boyunca benden yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli ekip arkadaşım İnönü Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Arş. Grv. Canbolat GÜRSES, biyolog arkadaşım Sezin DEMİRTAŞ, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalından Mehmet Ali GÜZEL, İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümünden Hüseyin Ergün ULAŞ ve İnönü Üniversitesi Kimya Bölümünden Merve G. KARAASLAN ve Ahmet ULU'ya,

Tüm hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen değerli aileme,  
Ve büyükbabama...

Teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
1 GİRİŞ.....	1
1.1 Adrenomedullin.....	2
1.1.1 Gen yapısı.....	3
1.1.2 Protein yapısı.....	4
1.1.3 Sentezi.....	5
1.1.4 Reseptörleri.....	5
1.1.5 Mekanizma.....	6
1.1.6 Biyolojik etkileri.....	8
1.2 Sirtuin 1.....	10
1.2.1 Gen yapısı.....	10
1.2.2 Protein yapısı.....	11
1.2.3 Sentezi.....	11
1.2.4 Mekanizma.....	13
1.2.5 Biyolojik işlevleri.....	14
1.3 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü.....	16
1.3.1 Gen yapısı.....	16
1.3.2 Protein yapısı.....	18
1.3.3 Reseptörleri.....	18
1.3.4 Mekanizma.....	19
1.3.5 Biyolojik etkileri.....	19
1.4 Resveratrol.....	20
1.4.1 Biyoverimliliği.....	21
1.4.2 Mekanizma.....	21
1.4.3 Biyolojik etkileri.....	23
1.5 Anjiogenez.....	24
1.5.1 Endotelium.....	25
1.5.2 Biyolojik anjiogenez süreci.....	26
1.5.3 Anjiogenik faktörler.....	28
1.6 Adipoz Doku.....	30
1.6.1 Beyaz yağ doku.....	30
1.6.2 Kahverengi yağ doku.....	31
1.6.3 Adipogenez.....	36
1.7 Obezite.....	38
1.7.1 Adrenomedullin ve obezite.....	39
1.7.2 SIRT1 ve obezite.....	39
1.7.3 Anjiogenez ve obezite.....	40
1.7.4 Resveratrol ve obezite.....	41
1.7.5 Adipoz doku ve obezite.....	42
2 KAYNAK ÖZETLERİ.....	45
3 MATERYAL VE YÖNTEM.....	52
3.1 Deneylerde Kullanılan Sıçanlar.....	52

3.2	Obezite Oluşturulması.....	52
3.3	Adrenomedullin ve Resveratrol Uygulaması .....	54
3.4	Dokuların Toplanması.....	54
3.5	Dokuların Homojenizasyonu.....	54
3.6	RNA İzolasyonu .....	55
3.7	Protein İzolasyonu.....	56
3.7.1	Solüsyonlar.....	56
3.7.2	Prosedür.....	56
3.8	cDNA Sentezi.....	57
3.9	Semi-kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	58
3.10	Western Blot.....	60
3.10.1	Solüsyonlar ve reaktifler .....	60
3.10.2	Prosedür.....	62
3.11	İstatistiksel Analizler.....	64
4	ARAŞTIRMA BULGULARI .....	65
4.1	Obezitenin Sağlanması .....	65
4.2	Semi-kantitatif PZR Bulguları .....	67
4.3	Western Blot Bulguları.....	74
5	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	80
5.1	BYD AdM Sonuçları.....	80
5.2	KYD AdM Sonuçları .....	83
5.3	BYD SIRT1 Sonuçları .....	85
5.4	KYD SIRT1 Sonuçları .....	89
5.5	BYD VEGF-A Sonuçları .....	92
5.6	KYD VEGF-A Sonuçları .....	96
6	KAYNAKLAR.....	103
7	EKLER .....	134



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Adrenomedullin geni, preproadrenomedullin ve adrenomedullin sentezinin şematik gösterimi .....	4
Şekil 1.2.	İnsan ve sıçan adrenomedullin aminoasit dizilerinin karşılaştırılması .....	4
Şekil 1.3.	Adrenomedullinin sentezi ve posttranslasyonel modifikasyonu.....	6
Şekil 1.4.	Adrenomedullinin şematik hücre sinyal mekanizması .....	7
Şekil 1.5.	Adrenomedullinin biyolojik etkileri .....	9
Şekil 1.6.	İnsan SIRT1 geni .....	10
Şekil 1.7.	İnsan SIRT1 protein yapısı .....	11
Şekil 1.8.	SIRT1 ifadesinin ve aktivitesinin düzenlenmesi.....	13
Şekil 1.9.	Sirtuinlerin enzimatik aktiviteleri .....	14
Şekil 1.10.	VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D'nin gen yapıları .....	17
Şekil 1.11.	VEGFR'lerin şematik aktivasyonu .....	19
Şekil 1.12.	Vasküler endotelial büyüme faktörünün basitleştirilmiş yolağı .....	20
Şekil 1.13.	Resveratrolün stereoizomerleri .....	21
Şekil 1.14.	Resveratrolün SIRT1'i aktive etme mekanizması .....	22
Şekil 1.15.	Resveratrolün antioksidatif aktivitesi üzerine ileri sürülen hidrojen atom transfer ve elektron transfer mekanizmaları.....	23
Şekil 1.16.	Endotelium .....	26
Şekil 1.17.	Damar oluşumunun aşamaları.....	28
Şekil 1.18.	Yağ dokusu çeşitleri ve görevleri .....	30
Şekil 1.19.	Beyaz ve kahverengi adiposit morfolojisi arasındaki farkın şematik ve transmisyon mikroskop görüntüsü .....	31
Şekil 1.20.	Kahverengi ve beyaz yağ dokular .....	32
Şekil 1.21.	Memeli hücrelerinde termogenez ve oksidatif fosforilasyon.....	33
Şekil 1.22.	UCP1-bağımlı termogenezin teorik gösterimi .....	34
Şekil 1.23.	Mezenşimal öncül hücrelerin beyaz ve kahverengi adipositlere farklılaşması .....	37
Şekil 1.24.	Kahverengi ve beyaz adipositler arasındaki gelişimsel hiyerarşi .....	38
Şekil 3.1.	cDNA sentezi basamakları.....	58
Şekil 3.2.	<i>AdM</i> , <i>VEGF-A</i> ve <i>SIRT1</i> için gradient PZR basamakları .....	60
Şekil 4.1.	Normal ve obez gruplarda kilo artışı .....	66
Şekil 4.2.	Semi-kantitatif PZR jel görüntüleri .....	69
Şekil 4.3.	BYD ve KYD semi- kantitatif PZR grafikleri .....	73
Şekil 4.4.	Protein konsantrasyonu standart eğrisi .....	74
Şekil 4.5.	Western Blot membran görüntüleri .....	76
Şekil 4.6.	BYD ve KYD Western Blot grafikleri .....	79

## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.1.	SIRT1'in hedefi olduğu tanımlanan proteinler .....	15
Çizelge 1.2.	Anjiogenik aktivatör ve inhibitörler .....	29
Çizelge 1.3.	BYD ve KYD arasındaki farklar .....	35
Çizelge 3.1.	Deney grupları .....	52
Çizelge 3.2.	Hazır yem içeriği .....	53
Çizelge 3.3.	Yüksek yağ diyeti besinsel profili .....	53
Çizelge 3.4.	cDNA hazırlık karışımı .....	57
Çizelge 3.5.	cDNA sentezi karışımı .....	58
Çizelge 3.6.	Primerler .....	59
Çizelge 3.7.	PZR karışımı .....	59
Çizelge 3.8.	Antikorlar .....	63
Çizelge 4.1.	Kilo artışı .....	65
Çizelge 4.2.	RNA konsantrasyonları .....	67
Çizelge 4.3.	BYD <i>AdM</i> , <i>SIRT1</i> semi- kantitatif PZR ANOVA sonuçları .....	70
Çizelge 4.4.	BYD <i>VEGF-A</i> semi- kantitatif PZR ANOVA sonuçları .....	71
Çizelge 4.5.	KYD semi- kantitatif PZR ANOVA sonuçları .....	72
Çizelge 4.7.	Protein konsantrasyonları .....	75
Çizelge 4.8.	BYD Western ANOVA sonuçları .....	77
Çizelge 4.9.	KYD Western ANOVA sonuçları .....	78

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AdM	Adrenomedullin
ADMA	Asimetrik dimetilarjinin
AMPK	AMP-aktive protein kinaz
Ang	Anjiopietin
ANP	Atriyal natriüretik peptid
AP-2	Antikor protein-2
APE1	Apuridik/aprimidinik endonukleaz 1
ATIR	Anjiyotensin II tip I reseptör
$\beta$ -AR	$\beta$ -adrenoreseptör
bFGF	Bazal fibroblast büyüme faktörü
BMAL1	Beyin ve kas aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator (AARNT) benzeri 1
BMP	Kemik morfojenik protein
BNP	Beyin natriüretik peptid
BYD	Beyaz yağ doku
DAG	Diaçil gliserol
C/EBP	CCAAT/enhansır bağlanma proteini
$\text{Ca}^{++}$	Sitozolik kalsiyum
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
CGRP	Kalsitonin geni ilişkili peptid
CHREBP	Karbohidrat yanıt element bağlanma proteini
CIDEA	Hücre ölümünü indükleyen DFFA benzeri efektör a
CL	Kalsitonin reseptörü benzeri
COX-2	Siklooksijenaz 2
CRE	cAMP-regüle enhansır
CREB	cAMP yanıt element bağlanma
CRY1	Kriptokrom 1
CTBP	C-terminal bağlanma proteini
C-terminal	Karboksil terminal
CTx	Kolera toksini
DTT	Ditiyotreitol
DYRK1	Çift yönlü spesifiklik Try-fosforile ve regüle kinaz 1
E2F1	E2F transkripsiyon faktör 1
ELOVL3	Çok uzun yağ asitlerinin uzama proteini 3
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentetaz
ER	Endoplazmik retikulum
ER $\alpha$	Östrojen reseptör $\alpha$
FBPaz	Fruktoz-1,6-bifosfataz
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FOXC2	Forkhead box protein C2
FOXO	Forkhead box protein O
FSH	Folikül stimulan hormonun
G6Paz	Glukoz-6-fosfataz
G proteini	Guanin nükleotit bağlanma regülatör proteini
HDAC	Histon deasetilaz
HEY2	Tüylü/parçalama enhansır ilişkili YRPW motif protein 2

HFD	Yüksek yağ diyeti
HIC1	Kanserde hipermetile 1
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IF- $\alpha/\beta$	İnterferon- $\alpha/\beta$
IL	İnterlökin
IP <sub>3</sub>	İnozitol trifosfat
i.m.	İntramüsküler
i.p.	İntraperitoneal
JNK	JUN N-terminal kinaz
KYD	Kahverengi yağ doku
LCFA	Uzun zincir yağ asiti
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein 1
MMP	Matriks metalloproteinaz
MYF5	Miyojenik faktör 5
MyoD	Miyojenik farklılaşma
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotit
NF- $\kappa$ B	Nükleer faktör- $\kappa$ B
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentetaz
NPR-C	Natriüretik peptid reseptör-C
N-terminal	Amino terminal
PA	Plazminojen aktivatör
PAI	Plazminojen aktivatör inhibitör
PARP	Poli(ADP-riboz) polimeraz
PEPCK	Fosfoenolpiruvat karboksilaz kinaz
PER2	Periyot 2
PET	Pozitron emisyon tomografi
PDGF	Trombosit kökenli büyüme faktörü
PDGFR	Trombosit kökenli büyüme faktör- $\beta$ reseptör
PGC1	Peroksizom proliferatör aktive reseptör- $\gamma$ koaktivatör 1
PGF	Plasenta büyüme faktörü
PKA	Protein kinaz A
PPAR $\gamma$	Peroksizom proliferatör aktive reseptör- $\gamma$
PRDM16	PR domain içeren 16
Pref-1	Preadiposit faktör 1
PVDF	Poliviniliden diflorür
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAMP	Reseptör aktivitesini düzenleyen protein
RIA	Radyoimmün test
RIP140	Reseptör etkileşim proteini 140
ROR $\gamma$	RAR ilişkili orfan reseptör $\gamma$
rtPCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
siklinB/CDK1	Siklin bağımlı kinaz 1
SIRT1	Sirtuin 1
SNP	Tek nükleotit polimorfizm
SREBP-1	Sterol regülatör element bağlanma proteini 1
STAT3	Transkripsiyon 3 sinyal transduser ve aktivatör
SUMO	Küçük ubikutin benzeri modifier

TGF	Transform edici büyüme faktörü
TIMP	Metalloproteinaz doku inhibitör
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktör $\alpha$
TK	Tirozin kinaz
TSP-1	Trombospondin-1
TZD	Thiazolidinedion
UCP1	Eşleşememe proteini-1
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR	Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
VKİ	Vücut kitle indeksi

# 1 GİRİŞ

Günümüzün modern yaşam koşulları, obeziteye zemin hazırlamakta ve gün geçtikçe dünyada obez bireylerin sayısı giderek artmaktadır. Ülkemiz de dahil olmak üzere birçok ülke obeziteye karşı savaş açmıştır. Obezite ve neden olduğu hastalıklar yaşam kalitesini düşürür, ülke ekonomisine büyük yük getirmektedir. Birçok laboratuvar ve bilim insanı bu hastalığa çare bulmak üzere çalışmaktadır. Fakat obeziteyi tamamen ortadan kaldıracak yan etkisiz, basit ve kesin bir tedavi veya ilaç henüz bulunamamıştır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan bütün antiobezite ilaçları iştahı baskılayarak veya bağırsaktan yağ emilimini azaltma yoluyla enerji alımını azaltırlar. Ancak bu ilaçların depresyon ve yağlı dışkılama gibi birçok ciddi yan etkileri bulunur. Cerrahi işlemler ağırlı ve risklidir. Ancak obezite tedavisinde son aşamadır. Bu nedenle obezite tedavisinde alternatif stratejilere gerek duyulmaktadır. Bu çalışmanın amacı iştahı artırmadan, vücudun kendi potansiyellerini ve iyileştirme gücünü kullanarak obezitenin geriletilip geriletilmeyeceğini araştırmaktır. Ayrıca, özellikle beyaz ve kahverengi yağ dokularında anjiyogenik faktörlerin etkilerini karşılaştırmak ve enerji düzenlemesinde rol oynayan sirtuin 1 (SIRT1) proteininin gen ifadesini araştırmaktır.

Daha önceden varlığı bilinen, ancak 2003 yılından itibaren araştırmalara konu olan resveratrol, obesite çalışmalarında da dikkat çeken bir molekül haline gelmiştir (Rayalam vd., 2008). Resveratrol, *SIRT1* genini aktive eden, hücre enerji metabolizmasını ve mitokondriyal homeostaziyi düzenleyen önemli, küçük bir moleküldür.

Anjiyenez diğer tüm dokularda olduğu gibi, yağ dokusunun damarlanması ve beslenmesinde önemli rol oynar (Cao, 2007). Anjiyogenik faktörler arasında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), interlökinler, matris metalloproteinaz (MMP)'lar ve çoklu etkilere sahip adrenomedullin (AdM) peptidi yer alır. AdM ve resveratrolün bu bilinen özellikleri sayesinde obez sıçanların kahverengi ve beyaz yağ dokusu üzerindeki etkileri ve buna bağlı olarak AdM, VEGF ve SIRT1 düzeyleri araştırılmıştır.

Kilo alma olgusunda beyaz yağ dokusunda artış olur (Rosen ve Spiegelman, 2006). Buna karşılık enerji metabolizmasının düzenlenmesinde kahverengi yağ dokusu etkilidir (Miao ve Li, 2012). Çalışmada beyaz yağ dokusunun aktivitesinin

azaltılması, alınan besinlerin kilo alma yerine enerjiye dönüştürülmesi üzerine etkili bazı faktörlerin araştırılması hedeflenmiştir.

Aynı türün bireylerinde genomun aynı olması ve genom projesiyle insan gen sayılarının neredeyse belli olmasını sağlayan bilimsel çalışmalar, proteomik çalışmaların önünü açmıştır. Aynı türün bireyleri, aynı genoma sahip olmalarına rağmen bu genlerin ürünü olan proteinler arasındaki farklılık ve çeşitliliğin obezitede de olabileceği dikkate alındığında, obeziteyle mücadelede genel yaklaşım yerine bireysel yaklaşım akla daha uygundur. Muhtemelen bireysel proteomik farklılığın anjiogenik faktörler düzeyinde de olması muhtemeldir. Bu çalışmanın nihai hedeflerinden biri de kahverengi ve beyaz yağ dokusunda anjiogenik faktörlerin önemini ortaya çıkarmaktır.

Çalışma, klinik çalışmalara katkıda bulunabilecek moleküler düzeyde bir temel araştırmadır. Bu amaçla *AdM*, *VEGF* ve enerji metabolizmasını düzenleyen genlerden *SIRT1* gen ifadesi araştırılmış, kontrol ve obez sıçanlarda resveratrol ve AdM'in etkilerine verilen cevaplar karşılaştırılmıştır.

## 1.1 Adrenomedullin

AdM, ilk olarak Japonya'da, 1993 yılında bir grup Japon bilim insanı tarafından feokromositoma dokusundan izole edilmiştir. Trombosit siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyesini artıran bir peptidi araştıran bilim insanları, AdM'in böyle bir biyolojik aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu peptid saflaştırılmış, dizi analizi yapılmış ve adrenal medulladan köken aldığı için "adrenomedullin" adı verilmiştir. AdM hakkındaki ilk makale Nisan 1993'te yayınlanmıştır. Makalede peptidin saflaştırılması, kan basıncına olan etkisi ve dolaşımdaki AdM'i ölçmek üzere geliştirilen özel radyoimmün testi (RIA)'nden de bahsedilmiştir (Kitamura vd., 1993). Üç ay sonra insan AdM'i (Kitamura vd., 1993) ve Eylül'de ise sıçan AdM'i kodlayan genin dizi analizi yapılmıştır (Sakata vd., 1993). İki yıl içerisinde pek çok klinik çalışmada plazma AdM seviyeleri ölçülmüş ve AdM'in ilk aday reseptörü tanımlanmıştır (Kapas vd., 1995).

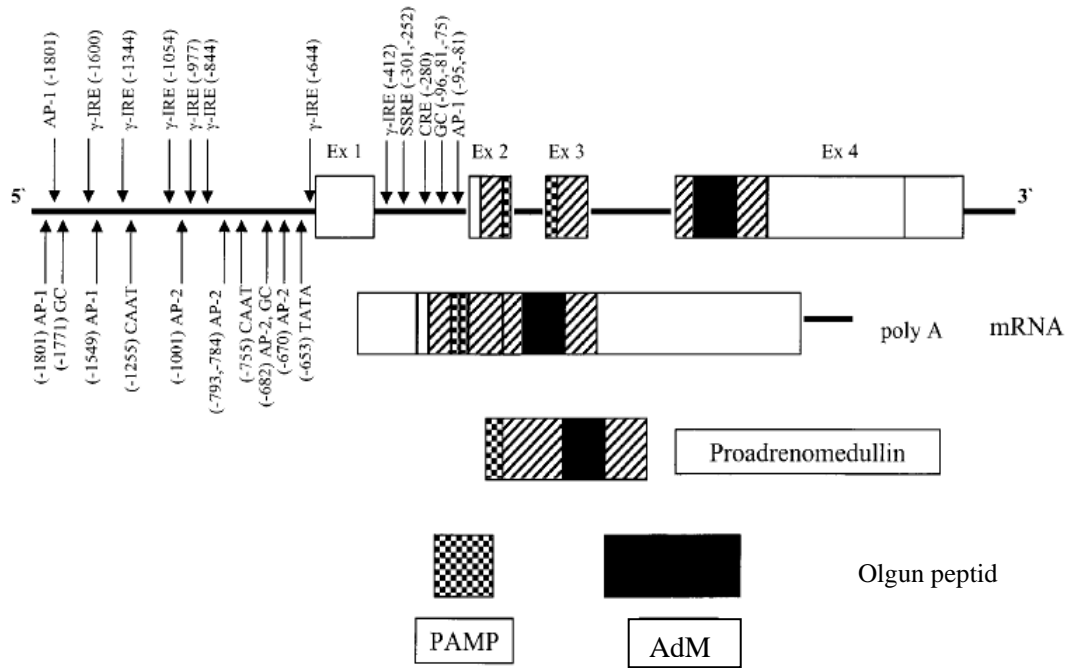
AdM birçok fonksiyona sahip, otokrin ve parakrin düzenleyici bir proteindir. Güçlü hipotensif aktiviteye sahiptir, ayrıca vazorelaksasyon, diüretik etki ve aldosteron salgılanmasını engellenmesi gibi birçok biyolojik aktivitesi bulunur. Çeşitli hücre soylarında proliferasyon, farklılaşma ve hücre göçünü düzenlediği gösterilmiştir (Hinson vd., 2000; Kitamura vd., 1993). Feokromositoma dokusunun

yanında, adrenal medulla, kalp, böbrek ve akciğer dokularında da yüksek miktarda *AdM* mRNA'sı gözlenmiştir (Kitamura vd., 1993). Daha sonra yapılan araştırmalar kan damarları, gastrointestinal sistem, karaciğer, tiroid, hipofiz bezi ve beyinde, özellikle de talamus ve hipotalamusta *AdM*'nin sentezlendiğini göstermiştir (Nussdorfer vd., 1997). Dolaşımında da *AdM*'e rastlanır, fakat bu en çok endotel hücrelerinden salınmasının bir sonucudur. Bu nedenle *AdM* nitrik oksit (NO) ve endotelin ile birlikte vasküler endotel salgılarından biri olarak kabul edilir. Normal plazma konsantrasyonu 1-10 pM arasındadır ve genellikle 2-3.5 pM'dür (Hinson vd., 2000). Plazmadaki yarı ömrünün yaklaşık olarak 21 dakika olduğu tahmin edilmektedir (Meeran vd., 1997). *AdM*, bulunduğu dokuda otokrin ve parakrin işlevlere sahip olmasına rağmen, dolaşımında bulunması ve intravenöz olarak uygulandığında önemli farmakolojik etkiler göstermesinden dolayı, bir hormon olarak kabul edilmektedir (Samson, 1999). *AdM* sentezi iskemik miyokardiyal hasar, sistemik inflamatör yanıt sendromu, hemorajik şok ve endotoksik şok, hemodiyaliz kronik hipotansiyonu, siroz, pulmoner hipertansiyon, hipoksi, oksidatif stres ve aterogenez gibi patofizyolojik durumlarda artar (Koo vd., 2001).

### 1.1.1 Gen yapısı

*AdM* geni, insanda 11. kromozomunun kısa kolunda (11p15.4) bulunur. Dört ekson ve üç introndan oluşur (Kitamura vd., 1993). Posttranslasyonel modifikasyondan sonra iki biyoaktif peptidi [*AdM* ve proadrenomedullin N-terminal 20 peptid (PAMP)] kodlar (Nakamura vd., 2006). İkinci ve üçüncü ekzonlar PAMP'yi, dördüncü ekzon ise *AdM*'in olgun formunu kodlar (Kitamura vd., 1993). Genin 5' ucunda TATA, CAAT, GC kutuları bulunur. Promotor bölgesinde aktivatör protein-2 (AP-2) ve cAMP-regüle enhansır (CRE)'a ait pek çok bağlanma bölgesi vardır (Şekil 1.1). Ayrıca *AdM* geninin promotorunda nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) bölgeleri de bulunmuştur (Ishimitsu vd., 1994). İlk intron transkripsiyonel regülasyonu sağlayan çeşitli elementleri de içerir. Bu yolla *AdM* üretimi büyük ölçüde düzenlenir (Cheyuo vd., 2012).





**Şekil 1.1.** Adrenomedullin geni, preproadrenomedullin ve adrenomedullin sentezinin şematik gösterimi. Oklar 5' ucunda kodlanmayan bilinen regülatör dizileri ve insan adrenomedullin geninin intron 1 bölgesini göstermektedir (Hinson vd., 2000)

### 1.1.2 Protein yapısı

İnsan AdM'i 52 aminoasitten oluşur ve 16. ve 21. aminoasitleri arasında bir disülfid köprüsü vardır (Kitamura vd., 1993). Bu halka yapısı, reseptöre bağlanmasında önemlidir (Muff vd., 2003). C-terminalinde amid grubu içeren bir tirozin bulunur (Kitamura vd., 1993). Sıçan AdM'i ise 50 aminoasitten oluşur. İnsan AdM'i ile karşılaştırıldığında (Şekil 1.2) 2 delesyon ve 6 substitisyon içerir (Sakata vd., 1993). Kalsitonin geni ilişkili peptid (CGRP) ile %24 homoloji gösterdiğinden dolayı kalsitonin/CGRP/amilin peptid ailesine dahil edilir (Kitamura vd., 1993), C-terminaldeki amid yapısı ve molekül içi disülfid köprü korunmuştur (Zudaire vd., 2006). AdM ve CGRP yapılarında bulunan bu ortak yapılar biyolojik aktiviteleri için gereklidir (Muff vd., 2003).

**İnsan** YRQSMNNFQGLRSFGCRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDNVAPRISKISPQGY-NH<sub>2</sub>  
**Sıçan** YRQSMN--QGSRS<sup>T</sup>GCRFGTCT<sup>M</sup>QKLAHQIYQFTDKDKD<sup>GM</sup>APRIN<sup>K</sup>ISPQGY-NH<sub>2</sub>

**Şekil 1.2.** İnsan ve sıçan adrenomedullin aminoasit dizilerinin karşılaştırılması (Hinson vd., 2000)

### 1.1.3 Sentezi

AdM, preproadrenomedullin denilen bir prekürsör molekül olarak sentezlenir. Hem sıçanda hem de insanda bu prokürsör 185 aminoasitten oluşur (Kitamura vd., 1993; Sakata vd., 1993). Preproadrenomedullin amino terminalinde (N-terminal) düz endoplazmik retikulum (ER)'u hedefleyen 21 aminoasitten oluşan bir sinyal peptid bulunur. Bu sinyal peptid ER lümeninde ayrılır, geriye 164 aminoasit içeren proadrenomedullin kalır (Kitamura vd., 1993). AdM, C-terminalinde glisin aminoasiti bulunan bir ara ürün olarak sentezlenir (Kitamura vd., 1998). Proadrenomedullin, salgı granüllerine gitmek üzere ER'den Golgi aparatına doğru giderken ekzopeptid, endopeptid ve C-terminal glisin aminoasiti amidasyon enzimleriyle işlenerek biyolojik olarak aktif iki hormonu oluşturur: AdM tamamen 4. ekzon, PAMP ise 2. ve 3. ekzonlar tarafından kodlanır (Şekil 1.3) (Cheyuo vd., 2012; Kitamura vd., 1993). AdM ve PAMP ekzositoz ile salgılanır (Martinez vd., 2001).

*AdM* geninden, alternatif kesip biçimle sırasıyla iki farklı preprohormonu kodlayan iki mRNA meydana gelir. Kısa olan mRNA ekson 1-4'ü içerir, AdM ve PAMP peptidlerini oluşturur; uzun mRNA ise erken bir sonlandırma kodonu içeren 3. intron ile birleşmiştir ve sadece PAMP ifade edilir (Martinez vd., 2001).

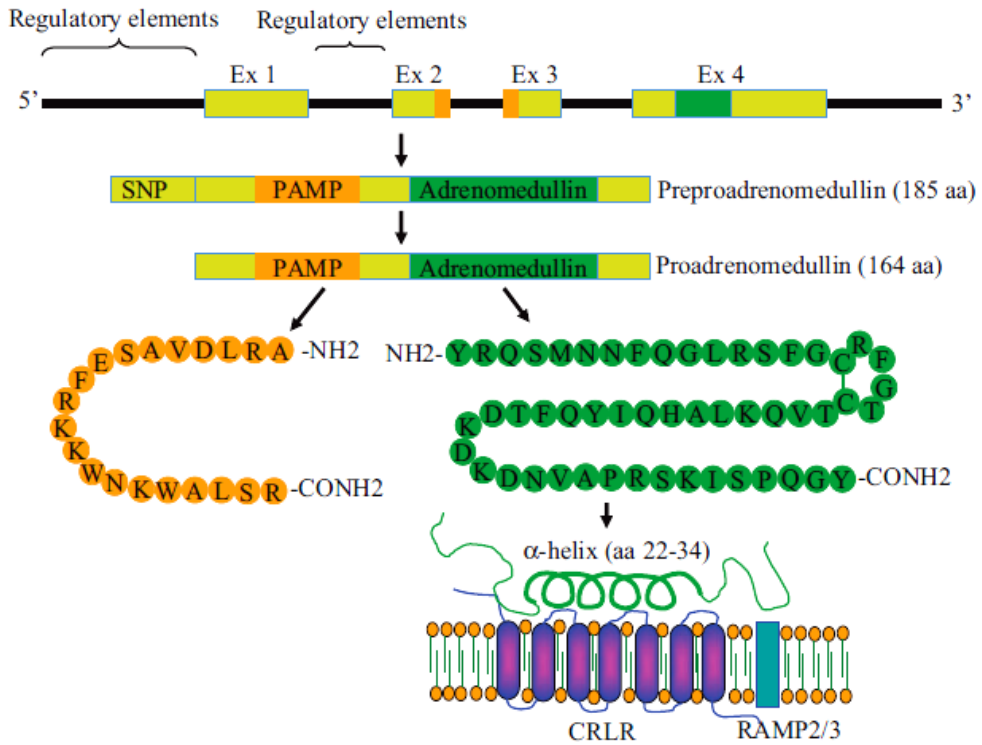
Reseptöre bağlı AdM, 22-34 aminoasitten oluşan merkezi bir  $\alpha$ -helikal bölge içerir. N ve C-terminalinde düzensiz segmentler bulunur (Şekil 1.3). Reseptöre bağlı olmayan AdM suda çözünür ve düzensiz bir yapısı vardır, membranla etkileşimi sonrası üç boyutlu yapısını kazanır (Cheyuo vd., 2012).

AdM ifadesinin çeşitli hücre kültürlerinde tümör nekroz faktör  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gibi sitokinler, büyüme faktörleri, hipoksiya, kan akış gerilim stresi (shear stress) (Li vd., 2007) ve insulin (Harmancey vd., 2007) gibi uyarılarla düzenlendiği gösterilmiştir.

### 1.1.4 Reseptörleri

Kalsitonin ve kalsitonin reseptörü benzeri (CL) reseptörler, yedi transmembran domeynli guanin nükleotit bağlanma regülatör proteinine (G proteini) bağlı reseptörlerin sınıf B ailesine dahildir. CL reseptörlerinin ifade edilmesi için reseptör aktivitesini düzenleyen proteinler (RAMP) gerekir. RAMP1, -2 ve -3; hücre içi 10 aminoasitten oluşan C-terminale ve yaklaşık 120 aminoasitten oluşan hücre dışı N-terminal ve tek transmembran domeyne sahip proteinlerdir. RAMP1 ve CL reseptörü, hücre yüzeyinde heterodimer oluşturarak CGRP reseptörünü meydana

getirirler (Şekil 1.3). RAMP2 ve -3 ile CL reseptörlerinin birlikte ifade edilmesi sonucu, sırasıyla AdM<sub>1</sub> ve AdM<sub>2</sub> reseptörleri oluşur (Muff vd., 2003). AdM otokrin ve/veya parakrin vazodilatör bir hormondur (Koo vd., 2001). Radyoaktif olarak etiketlenmiş AdM kullanılarak AdM reseptörlerinin bulunduğu organlar tespit edilmiştir. AdM özgül bağlanma bölgeleri bağırsak, kalp, akciğerler, dalak, karaciğer, soleus, diafram ve omurilik membranlarında gösterilmiştir (Sakata vd., 1993).



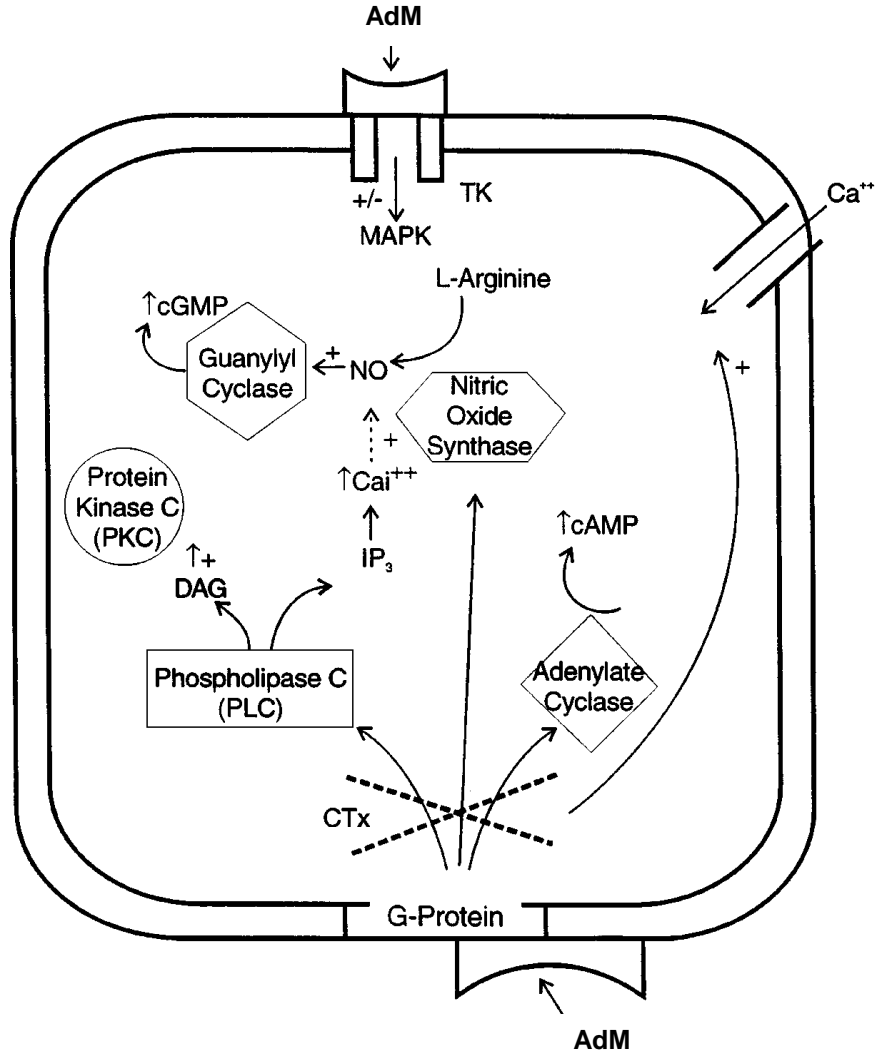
**Şekil 1.3.** Adrenomedullinin sentezi ve posttranslasyonel modifikasyonu (Cheyuo vd., 2012)

### 1.1.5 Mekanizma

AdM vazodilatör etkisini iki farklı mekanizma ile gösterir:

**Doğrudan etkisi:** AdM, vasküler düz kas hücreleri üzerindeki AdM reseptörlerine doğrudan etki eder. AdM reseptörlerinin G proteinleri aracılığıyla adenilat siklazla birleşmesi sonucu, hücre içi cAMP miktarı artar (Koo vd., 2001). cAMP, cAMP-bağımlı protein kinaz (protein kinaz A, PKA)'ı aktive eder. PKA, miyozin hafif zincir kinazı daha az aktif olan fosforile formuna çevirir (Şekil 1.4). Bunun sonucunda düz kaslarda gevşeme ve vazodilasyon sağlanır (Shimekake vd., 1995).

**Dolaylı etkisi:** AdM, vasküler endotel hücrelerinde  $Ca^{+2}$ 'nin mobilizasyonunu arttırarak konstitütif nitrik oksit sentetaz (NOS)'ı aktive eder ve dolaylı olarak güçlü bir vazodilatör olan nitrik oksit (NO) miktarını artırma yoluyla vazodilasyonu sağlar (Koo vd., 2001). AdM, G proteini aracılığıyla adenilil siklaz ve fosfolipaz C'yi aktive eder. Bu G proteini mekanizması kolera toksinine duyarlıdır. İnositol trifosfat ( $IP_3$ ) üretimi sonucu sitozolik kalsiyum konsantrasyonu artar ve bu durum hücre membranındaki kalsiyum kanalının açılması ile sürdürülür. Böylece sitozolik kalsiyumun artmasıyla NOS aktive olur (Şekil 1.4) (Meeran vd., 1997; Samson, 1999).



**Şekil 1.4.** Adrenomedullinin şematik hücre sinyal mekanizması. Adrenomedullin, AdM; NO, nitrik oksit; cGMP, siklik guanozin monofosfat;  $IP_3$ , inozitol trifosfat; DAG, diaçil gliserol; CTx, kolera toksini; TK, tirozin kinaz; MAPK, mitojen aktive protein kinaz;  $Ca^{++}$ , sitozolik kalsiyum (Samson, 1999)

### 1.1.6 Biyolojik etkileri

AdM'in birçok organda farklı işlevleri vardır. Vazodilatör, bronkodilatör, hormon salgı düzenleyici, nörotransmitter, antimikrobiyal ajan ve diüretik etkinin kontrolcüsü olarak görev yapar (Şekil 1.5) (Nakamura vd., 2006). En önemli etkileri hipotansiyon ve diürez/natriürezdir. Bu etkileriyle sıvı ve elektrolit homeostazını sağlar. AdM tuz ve su alımını; olasılıkla tuz ve su atılımını da kontrol eder (Samson, 1999).

AdM, kardiyovasküler sistemde, sistemik vasküler direnci düşürerek hipotansiyona neden olur (Bene vd., 2000). AdM'in intravenöz olarak verilmesinin ardından, vazodilasyon etkisiyle hem sistolik hem de diastolik kan basıncında doza bağımlı kademeli düşüş görülür (Oya vd., 2000). Hipertansif hastalarda AdM plazma seviyeleri, kan basıncı artışı ve hastalığın şiddetiyle uygunluk gösterir (Ishimitsu, Nishikimi vd., 1994; Kitamura vd., 1994; Kohno vd., 1996). AdM olasılıkla artan kan damarı tonusuna karşı koruyucu bir etki gösterir. Ancak etkili antihipertansif tedavi uygulanan hastalarda bile plazma AdM seviyelerinin yüksek kaldığı bulunmuştur (Kohno vd., 1996).

AdM ve reseptörleri, merkezi sinir sistemi ve hücresele bileşenlerinde de bulunur. Nörotransmitter, nöromodülatör ve nörohormon olarak görev yapar. Fakat AdM etkisinin kesin yeri tam belli değildir. Ancak hipotalamustaki paraventriküler nukleus ve supraoptik nukleuslar en olası etki bölgeleridir (Sato vd., 1995). AdM merkezi sinir sisteminde su içme (Murphy ve Samson, 1995) ve tuz isteğini (Samson ve Murphy, 1997) azaltır ve gastrik boşalmayı engeller (Martínez vd., 1997). AdM'in periferdeki hipotansif etkisine beyinde rastlanmaz (Shimokubo vd., 1995). AdM'in beyindeki en önemli rolü, hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenin düzenlenmesinden sorumlu olmasıdır (Samson vd., 1998).

Ek olarak AdM insan plazması ve idrarında bulunur. Üriner sistem içindeki seviyeler plazma seviyelerinden yüksektir (Sato vd., 1995). AdM, glomerular filtrasyon oranını artırır ve distal tübüllerdeki sodyum geri emiliminde düşüşe neden olur (Jougasaki vd., 1995). Klinik olarak, plazma AdM seviyeleri, kronik renal yetmezliği olan hastalarda artar. AdM sıvı ve elektrolit homeostazını sağlayan renal regülasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Jougasaki ve Burnett, 2000).

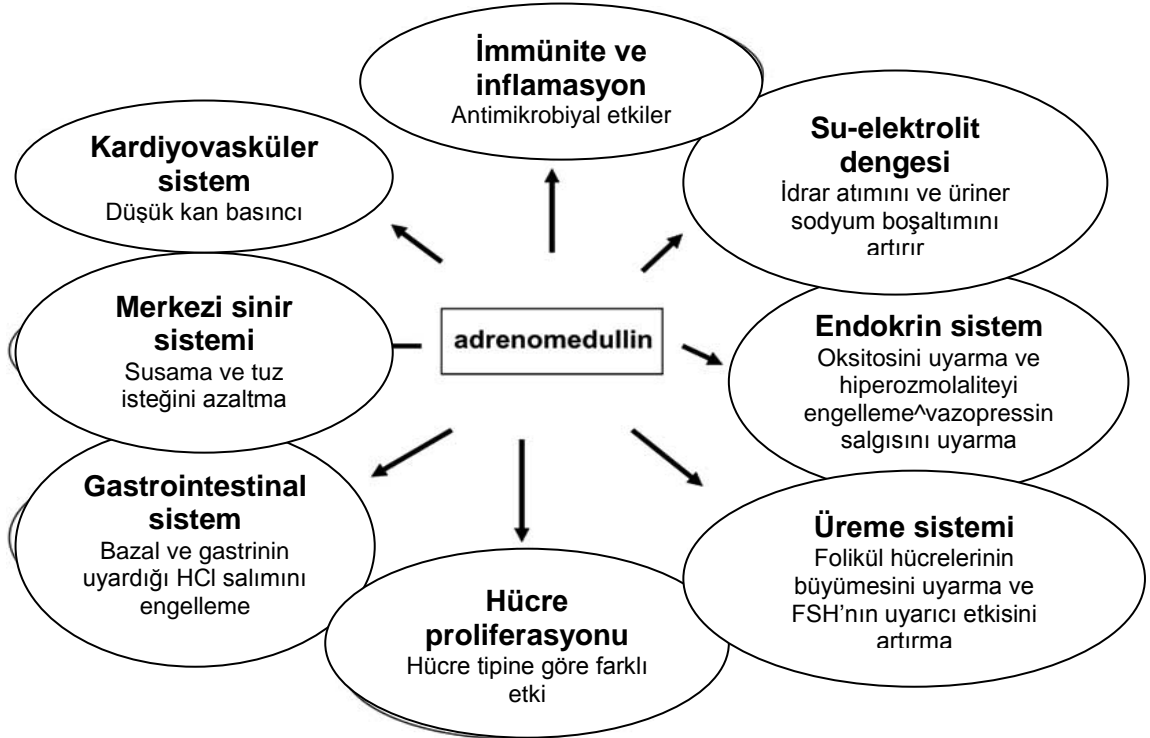
Endokrin sistemde AdM birçok etkiye sahiptir. Hipofiz bezinde adrenokortikotropik hormon salınımını engeller (Parkes ve May, 1995). Hem insanda

hem de sıçanda adrenal korteksin salgı aktivitesini etkiler; aldosteron üretimini önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir (Yamaguchi vd., 1996). Overde granüloza hücrelerinde üretilir ve foliküler faz boyunca artar. Hem bu hücrelerin büyümesini stimüle eder, hem de folikül stimulan hormonun (FSH) etkisini artırır (Charles vd., 1998). AdM uterus kontraktilitesi, embriyogenez, plasental büyüme ve anjiogenezi düzenler (Garayoa vd., 2002). Pankreasta insülin salgısını uyarır (Mulder vd., 1996).

Memelilerde birçok antimikrobiyal peptid mukozal epitel tarafından üretilir. AdM ifadesi ve birikiminin epitel yüzeyi (deri, akciğer, ürogenital sistem, sindirim sistemi ve diğerleri) ve vücut sıvılarında (plazma, ter, süt, tükürük, amniyotik sıvı ve diğerleri) (Bunton vd., 2004; Martinez vd., 2001) olması antimikrobiyal ajan olarak rol oynadığını göstermektedir. Septik şok esnasında plazma AdM seviyeleri artar (Hirata vd., 1996).

AdM gastrointestinal motor ve salgılayıcı fonksiyonları üzerine etkilidir. Gastrik boşalmayı azaltır (Martínez vd., 1997), gastrik asit salgılanmasını engeller (Rossowski vd., 1997). Ayrıca gastrik mukoza bütünlüğü üzerine etkilidir (Fukuda vd., 1999).

AdM mitojenik aktivite ve apoptozisi önleme yeteneğine sahiptir (Martinez vd, 1995). Bu özellikleriyle tümör proliferasyonu ve anjiogenezi artırır, apoptozisi engeller. Böylece karsinogenez ve tümör gelişimine karıştır (Nikitenko vd, 2006).



Şekil 1.5. Adrenomedullinin biyolojik etkileri (Nakamura vd, 2006)

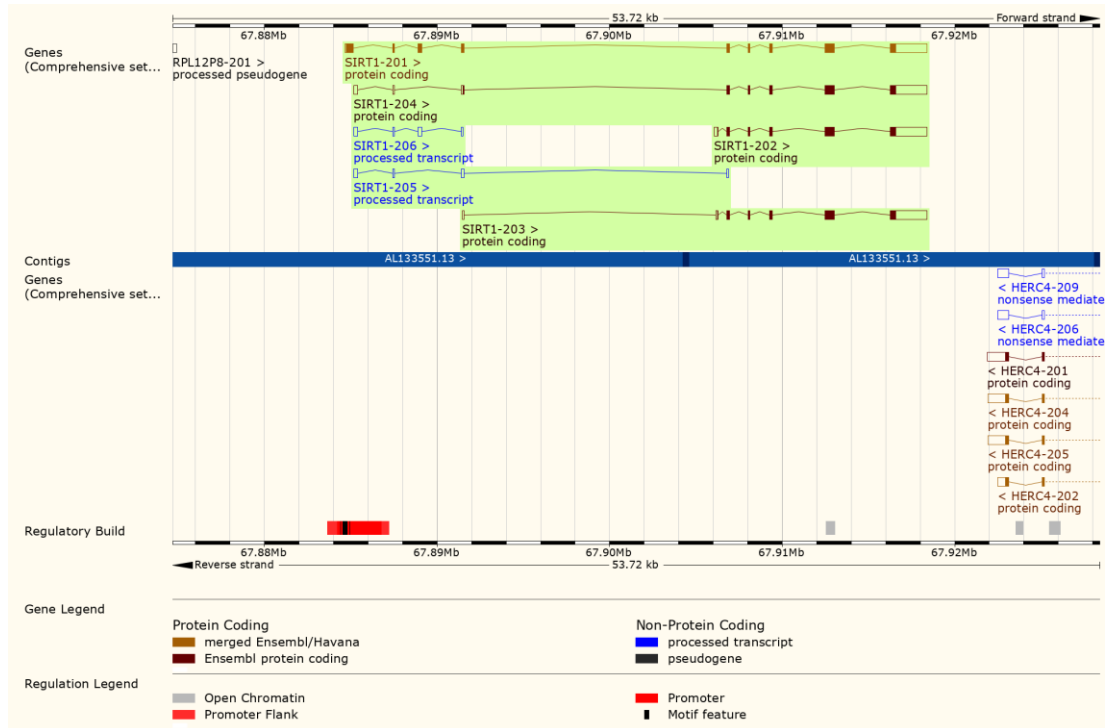
## 1.2 Sirtuin 1

Suskun enformasyon regülatör (SIR) genleri (sirtuinler) bakterilerden memelilere kadar, neredeyse bütün türlerde korumuş bir protein ailesidir (Longo ve Kennedy, 2006). Memelilerde yedi sirtuin geni (SIRT1-7) tanımlanmıştır (Kelly, 2010a).

Sirtuinler veya sınıf III histon deasetilazlar (HDAC); protein deasetilazlar ve ADP-riboziltransferazlardır (Saunders ve Verdin, 2007). SIRT1, -2, -6 ve -7 nükleusta; SIRT1 ve -2 sitoplazmada ve SIRT3, -4 ve -5 mitokondride bulunur ve birçok dokuda ifade edilirler (Michishita vd., 2005). Deasetilasyon (SIRT1, -2, -3 ve -5) veya ADP-ribozilasyonla (SIRT4 ve -6) pek çok proteinde posttranslasyonel modifikasyon gerçekleştirirler (Saunders ve Verdin, 2007).

### 1.2.1 Gen yapısı

İnsan *SIRT1* geni 10. kromozomun uzun kolunda (10q21.3) bulunur (Frye, 1999), 11 ekzonu vardır (Şekil 1.6) (Ensembl genome browser, a). Sıçanlarda ise 20. kromozomun kısa kolunda (20p11) bulunur ve 9 ekzonu vardır (NCBI genome browser). İnsanda 6 kesip biçme varyantı bulunur (Ensembl genome browser, a). Sıçanda ise 1 transkripti vardır (Ensembl genome browser, b).



Şekil 1.6. İnsan SIRT1 geni (Ensembl genome browser, a)

### 1.2.2 Protein yapısı

SIRT1 (Şekil 1.7), *Saccharomyces cerevisiae* suskun eşleme tip enformasyon regülatör 2 homologudur. İnsandaki 6 kesip biçme varyantından 4 tanesi proteine dönüştürülür. Varyantları SIRT1-201, 747; SIRT1-204, 452; SIRT1-202 ve -203, 444 aminoasittir. SIRT1-206 ve -205 ise proteine dönüştürülmez (Ensembl genome browser, a). Sığındaki tek transkript SIRT1-201 ise 730 aminoasittir (Ensembl genome browser, b). İnsan SIRT1 proteini sirtuinlerde korunmuş olan katalitik merkez, hem N- hem de C-terminalinde yaklaşık 240 aminoasit kadar uzantılar içerir. Bu uzantılar regülatör proteinler ve substratlar için düzlem görevi yapar. İki nükleer lokalizasyon sinyali ve iki nükleer ihraç sinyali içerir. Bu iki sinyal arasındaki işlevsel denge, farklı hücrelerde proteinin yerinin sitoplazma veya nükleus olmasını belirler (Canto ve Auwerx, 2012).



Şekil 1.7. İnsan SIRT1 protein yapısı (Swiss-model)

### 1.2.3 Sentezi

SIRT1 ifadesi çeşitli fiziksel durumlarda değişiklik gösterir. Açlık durumu kopyalanmayı uyarırken yüksek yağlı diyet engeller. SIRT1'in promotorunda forkhead box protein 1 (FOXO1), karbohidrat yanıt element bağlanma proteini (CHREBP), cAMP yanıt element bağlanma (CREB) ve peroksizom proliferatör aktive reseptörleri (PPAR) gibi transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgeleri bulunur. PPAR $\alpha/\beta$  (veya PPAR $\delta$ ), FOXO1 ve CREB SIRT1 ifadesini artırır; PPAR $\gamma$ ,

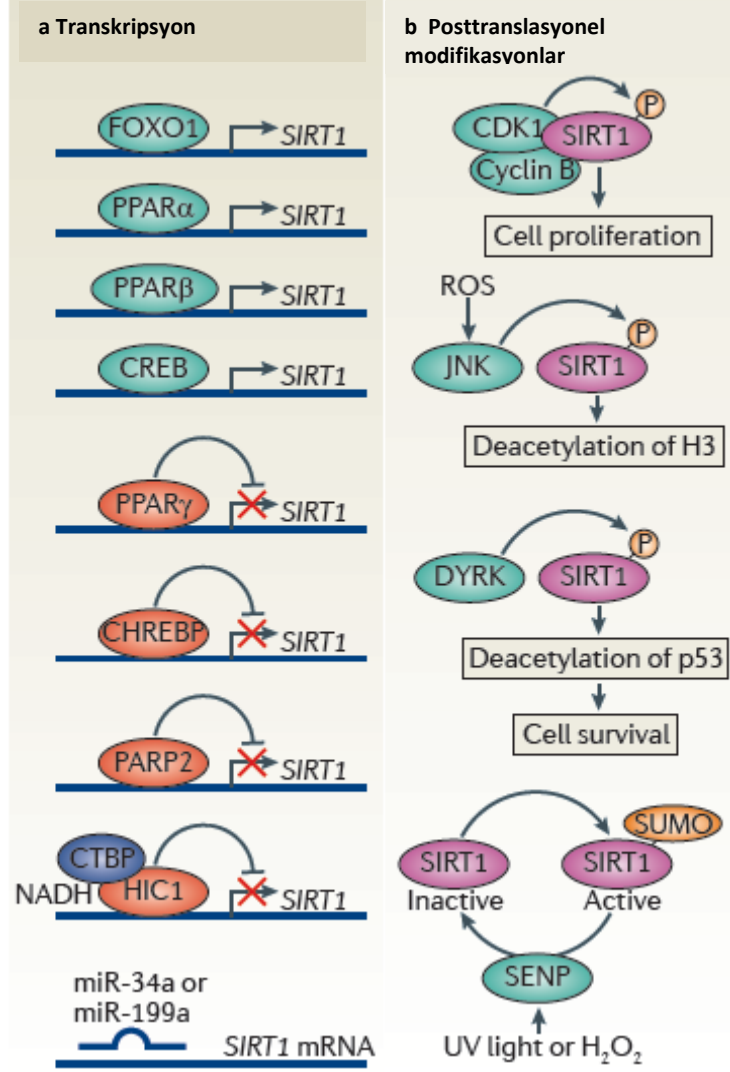


kanserde hipermetile 1 (HIC1), poli(ADP-riboz) polimeraz 2 (PARP2) ve CHREBP ise baskılar. HIC1 tarafından baskılanan SIRT1 ifadesi C-terminal bağlanma proteini (CTBP) aracılığıyla gerçekleşir. Ayrıca transkripsiyon mikroRNA'lar tarafından da düzenlenir (Şekil 1.8a) (Houtkooper vd., 2012).

SIRT1'in kopyalanması *SIRT1* promotorunda, forkhead box protein O3a (FOXO3a) ve p53 tarafından düzenlenir. Sitoplazmik FOXO3a aktive edildikten sonra nükleusa geçer ve *SIRT1* promotorundaki iki bağlanma bölgesindeki p53'ün ayrılmasını sağlar. Örneğin E2F transkripsiyon faktör 1 (E2F1), *SIRT1* kopyalanmasının önemli bir pozitif düzenleyicisidir. *SIRT1* promotorunda iki E2F1 bağlanma bölgesi bulunur. SIRT1 E2F1'i deasetile ederek bu proteinin aktivitesini durdurur. Böylece *SIRT1*'in ifadesi ve kopyalanması azaltılarak *SIRT1* ifadesinin kontrolü sağlanır (Moore vd., 2012).

SIRT1 posttranskripsiyonel olarak siklin bağımlı kinaz 1 (siklin B/CDK1) kompleksi aracılığıyla fosforillenir ve böylece hücre döngüsünün ilerlemesi sağlanır (Moore vd., 2012). JUN N-terminal kinaz (JNK) da oksidatif stres esnasında SIRT1'i üç yerinden fosforiller. Bunun sonucunda H3 deasetile olur. SIRT1, tirozin fosforile ve regüle kinazlar çift yönlü spesiflik Try-fosforile ve regüle kinaz 1 (DYRK1) ve DYRK3'ün ikili özgülüğüyle Thr<sup>522</sup> rezidüsünden fosforillenir. Fosforilasyon sonucu p53 deasetile edilir ve hücre yaşamının devamı sağlanır (Şekil 1.8b) (Houtkooper vd., 2012).

SUMOlasyon küçük ubiquitin benzeri modifier (SUMO) proteinlerinin lizin aminoasitine kolavent olarak geri dönüşümlü bağlanmasıdır. UV ışığı ve hidrojen peroksit gibi genomik stresler SIRT1'in sentrin spesifik proteaz (SENP) tarafından desumolasyonuna ve hücre ölümüne neden olur (Houtkooper vd., 2012). Fosforilasyon ve sumolasyon SIRT1'in aktivitesini artırır (Moore vd., 2012).



**Şekil 1.8.** SIRT1 ifadesinin ve aktivitesinin düzenlenmesi, **a)** SIRT ifadesinin düzenlenmesi, **b)** SIRT1 posttranslasyonel modifikasyonlar (Houtkooper vd., 2012)

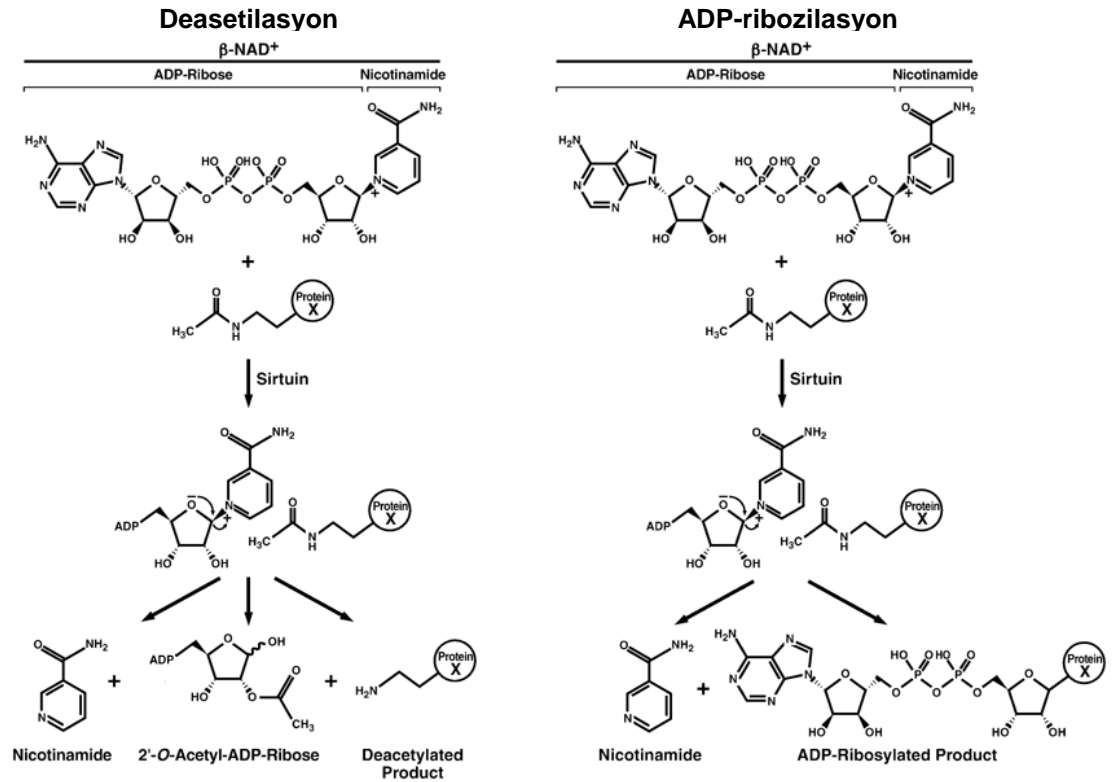
#### 1.2.4 Mekanizma

Bazı proteinlerin biyolojik aktiviteleri asetile ve deasetile edilerek düzenlenir. Peroksizom proliferatör aktive reseptör- $\gamma$  koaktivatör 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ), PPAR $\gamma$  ve eşleşme proteini-2 (UCP2) gibi proteinler asetile durumda aktiftirler. Sirtuin sistemi asetilasyon ve deasetilasyon arasındaki dengede önemli bir rol oynar. Bütün sirtuin genleri deasetilazları veya mono-ADP-riboziltransferazları kodlarlar. Deasetilaz aktivitesi olan sirtuinler, proteinleri aktive veya inhibe etme yeteneğine sahiptirler (Kelly, 2010a). Sirtuinler, histon ve histon olmayan proteinleri deasetile eden histon veya lizin deasetilazlardır. Kofaktör olarak  $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotit (NAD<sup>+</sup>)'e gereksinim duyarlar. Birçok proteinin lizin aminoasitlerini deasetile ederler. Örneğin histonlarda asetillizin aminoasitindeki asetil grubunu

koparılır ve  $\text{NAD}^{+}$ 'nın yarısı olan ADP-riboza aktarılır. Deasetile proteinin oluşmasıyla sonuçlanan bu reaksiyonlar,  $\text{NAD}^{+}$  koenziminin parçalanarak nikotinamid ve 2'-O-asetil-ADP-ribozun meydana gelmesine sebep olurlar (Michishita vd., 2005).

Sirtuin enzim ailesinin bazı üyeleri mono-riboziltransferaz (mono-ADP-riboziltransferaz) aktivitesine sahiptirler. Sirtuinler bu reaksiyonlarda, ADP-ribozilasyon denilen posttranskripsiyonel modifikasyonda,  $\text{NAD}^{+}$ 'daki ADP-riboz grubunu akseptör proteine aktarırlar. Bu reaksiyon sonunda mono-ADP-ribozize proteinler ve nikotinamid oluşur (Şekil 1.9) (Huang vd., 2010).

SIRT1,  $\text{NAD}^{+}$ -bağımlı protein deasetilazlar ailesine dahildir. SIRT1 proteini, insanda enerji regülasyonuna dahil olan birkaç transkripsiyon faktörünü ve histonları deasetile eder (Çizelge 1.1) (Clark vd., 2012). SIRT1 aracılı deasetilaz reaksiyonları çoğunlukla nükleerdir. Birçok dokudaki çoğu proteini hedefleyerek bu proteinlerin sonraki biyolojik aktivitelerini etkilerler (Kelly, 2010b).



Şekil 1.9. Sirtuinlerin enzimatik aktiviteleri (Saunders ve Verdin, 2007)

### 1.2.5 Biyolojik işlevleri

Sirtuinler diğer genleri kontrol eden regülatör genlerdir. Ayrıca diğer genlerden ve çevresel faktörlerden etkilenerek epigenetik yanıtlar verirler (Kelly, 2010a).

Sirtuinler yaşlanma süreci ve yaşam biçimine bağlı hastalıkların gelişimiyle engellenen metabolik yollarda bulunan, çok sayıda ve çeşitli transkripsiyon faktörlerini posttranskripsiyonel olarak etkilerler (Pedersen vd., 2008). Maya ve bakteriler gibi aşağı organizmalarda üreme ve kronolojik ömür uzunluğunu düzenlerler. Memelilerde ise memeli hastalıkları ve yaşlanmayla ilgili biyolojik durumları etkilerler (Vinciguerra vd., 2010). Çevresel koşullar, diyet ve yaşam tarzından oldukça etkilenirler. Epigenetik ifadeyi etkileyen faktörler kalori kısıtlaması, açlık, egzersiz, alkol, sigara, soğuk maruziyeti, oksidatif stres ve bitki bileşenleridir (resveratrol, kuersetin, Trabzon hurması oligomerik proantosiyanidin) (Kelly, 2010a). NAD<sup>+</sup> da SIRT1 aktivitesini artırır. Örneğin açlık, kalori kısıtlaması ve egzersiz esnasında kas, karaciğer ve beyaz yağ dokusunda NAD<sup>+</sup> miktarı artar (Houtkooper vd., 2012). Bu faktörler sirtuin gen ifadesini artırarak organizmanın çevresel koşullara adapte olmasını sağlarlar (Kelly, 2010a).

**Çizelge 1.1.** SIRT1'in hedefi olduğu tanımlanan proteinler (Kelly, 2010a)

<b>SIRT1'in hedefi olduğu tanımlanan proteinler</b>	
Peroksizom proliferatör aktive reseptör- $\gamma$	(PPAR $\gamma$ )
PPAR- $\gamma$ koaktivatör 1 $\alpha$	(PGC1 $\alpha$ )
Forkhead transkripsiyon faktörleri	(FOXO1 ve FOXO3)
AMP-aktive protein kinaz	(AMPK)
Poli(ADP-riboz) polimeraz 1	(PARP1)
Apurinik/aprimidinik endonukleaz 1	(APE1)
Asimetrik dimetilarjinin	(ADMA)
Anjiyotensin II tip I reseptör	(AT1R)
Östrojen reseptör $\alpha$	(ER $\alpha$ )
Androjen reseptör	
Sterol regülatör element bağlanma proteini 1	(SREBP1)
Transkripsiyon 3 sinyal transduser ve aktivatör	(STAT3)
Eşleşmeme proteini-2 ve -3	(UCP2 ve UCP3)
p53	
Tüylü/parçalama enhansır ilişkili YRPW motif protein 2	(HEY2)
Nükleer faktör- $\kappa$ B	NF- $\kappa$ B
Fosfoenolpiruvat karboksilaz kinaz	(PEPCK)
Fruktoz-1,6-bifosfataz	(FBPaz)
Glukoz-6-fosfataz	(G6Paz)
Histon H1, H3, H4	
Beyin ve kas aril hidrokarbon reseptör nükleer translokator (AARNT) benzeri 1 gibi sirkadien saat regülatör genler	(BMAL1)
Kriptokrom 1	(CRY1)
Periyot 2	(PER2)
RAR ilişkili orfan reseptör $\gamma$	(ROR $\gamma$ )

Yedi memeli sirtuin geninden en çok çalışılanı SIRT1'dir. SIRT1 enerji homeostazi, besin alımı ve vücut ağırlığını düzenleyen hipotalamusta çokça ifade edilir. Kalp, böbrek, akciğer, pankreas, iskelet kası, dalak ve beyaz yağda bulunur (Michishita vd., 2005). Enerjiye duyarlı bir moleküldür. Hücrenin enerji durumuna göre transkripsiyonel düzenlemeler yapar (Clark vd., 2012). Fazla SIRT1 ifade eden fareler daha uzun ömürlüdür. Ayrıca düşük kolesterol, kan şekeri, insülin seviyeleri görülür. Ek olarak nöronlarında mitokondri sayısını artırır (Vinciguerra vd., 2010). SIRT1 miktarının artışıyla PGC1 $\alpha$  deasetile edildiğinde glukoneogenez ve yağ asiti beta oksidasyonu artar, glikoliz azalır (Rodgers vd., 2005). Kaslarda ise mitokondriyal yağ asiti oksidasyon genleri aktive olur (Gerhart-Hines vd., 2007). SIRT1 tarafından deasetile olan PPAR $\gamma$  metabolizmayı lipoliz lehine çevirir ve serbest yağ asiti mobilizasyonunu artırır (Picard vd., 2004).

Resveratrol adipositlerin de dahil olduğu birçok hücre tipinde sirtuin aracılı yanıtları etkiler (Bai vd., 2007). Bazı çalışmalar resveratrolün SIRT1 aktivitesini doğrudan etkilediğini gösterirken, diğer çalışmalar SIRT1'i indükleyen diğer metabolik yolları etkileyebileceğini ileri sürmektedir (Tang, 2010). Başka bir görüş de, resveratrolün AMP-aktive protein kinaz (AMPK) gibi sirtuinlerin hedefleri olan proteinleri, sirtuin sistemine benzer yollarla postranskripsiyonel olarak etkilediğini ifade etmektedir (Um vd., 2010). Kalori kısıtlaması tek başına *SIRT1* ifadesini artırır. Resveratrol kalori kısıtlamasını taklit eder ve yüksek kalori diyetinin patolojik sonuçlarını azaltır (Cohen vd., 2004).

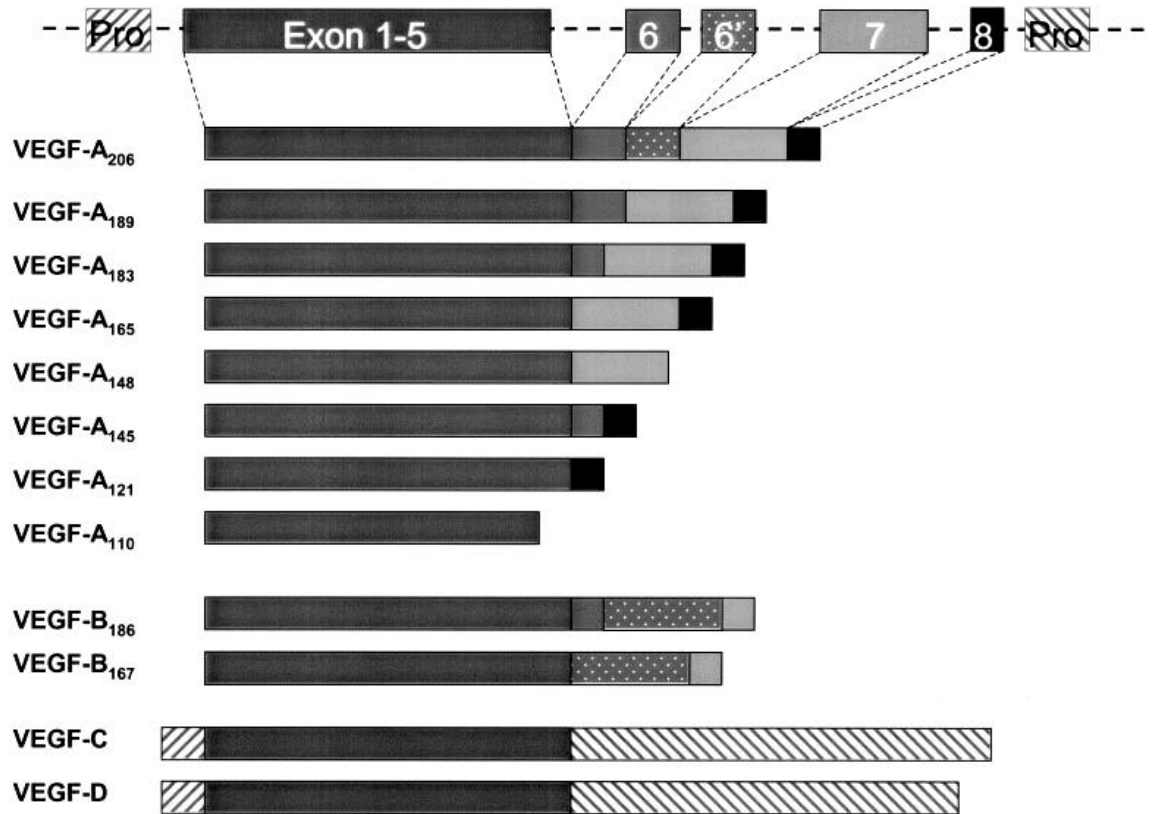
### **1.3 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü**

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF veya VEGF-A) anjiogenezin ana faktörüdür (Ferrara, 2002). VEGF-A şimdiye kadar tanımlanan en güçlü proanjiogenik proteindir. Akciğer, böbrek, kalp ve adrenal bezde yüksek seviyelerde *VEGF-A* mRNA'sı bulunur. Karaciğer, dalak ve gastrik mukozada ise daha düşük fakat halen saptanabilir miktarlarda VEGF-A görülür (Hoeben vd., 2004).

#### **1.3.1 Gen yapısı**

*VEGF-A* geni 6. kromozomun kısa kolunda (6p21.1) yer alır ve 8 ekzonu bulunur (Tischer vd., 1991). Sığıçında ise 9. kromozomun uzun kolunda (9q12) yer alır ve 8 ekzonu bulunur (NCBI genome browser, b). *VEGF-A* geninden alternatif kesip biçimle farklı özellik ve fonksiyonlarda VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-

A<sub>148</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> ve VEGF-A<sub>206</sub> olmak üzere en az 7 izoform meydana gelir (Şekil 1.10) (Distler vd., 2003). Plazmin, taban membranı bileşenlerini sindirerek doğrudan, zimojenlerden kolajenleri aktive ederek dolaylı yoldan ekstraselüler matriksin parçalanmasını sağlar. Böylece VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> ve VEGF-A<sub>206</sub>'yı serbest bırakır. Plazminin VEGF-A<sub>165</sub> ve VEGF-A<sub>189</sub>'u parçalanmasıyla 110 N-terminal aminoasitlik fragment (VEGF-A<sub>110</sub>) meydana gelir (Hoeben vd., 2004). VEGF-A<sub>189</sub> ve VEGF-A<sub>206</sub>'nın heparin sülfata affiniteleri vardır. Çoğunlukla hücre yüzeyi veya ekstraselüler matriksde bulunurlar. VEGF-A<sub>121</sub> ve kısmen VEGF-A<sub>165</sub> ise ekstraselüler sıvılarda bağlanmadan kalırlar (Houck vd, 1992). VEGF-A<sub>121</sub> en yaygın, VEGF-A<sub>165</sub> en etkili ve VEGF-A<sub>189</sub> ise en bol bulunan izoformlardır (Duarte vd., 2011). Sıçan VEGF'leri (VEGF-A<sub>120</sub>, VEGF-A<sub>144</sub>, VEGF-A<sub>164</sub> ve VEGF-A<sub>188</sub>) insan VEGF'leriyle aminoasit dizisi olarak %90 benzerlik gösterirler. Fakat sıçan VEGF'lerinin N-terminallerinde bir aminoasit (Gly 8) yoktur (Ishii vd., 2002).



Şekil 1.10. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D'nin gen yapıları (Hoeben vd., 2004)

### 1.3.2 Protein yapısı

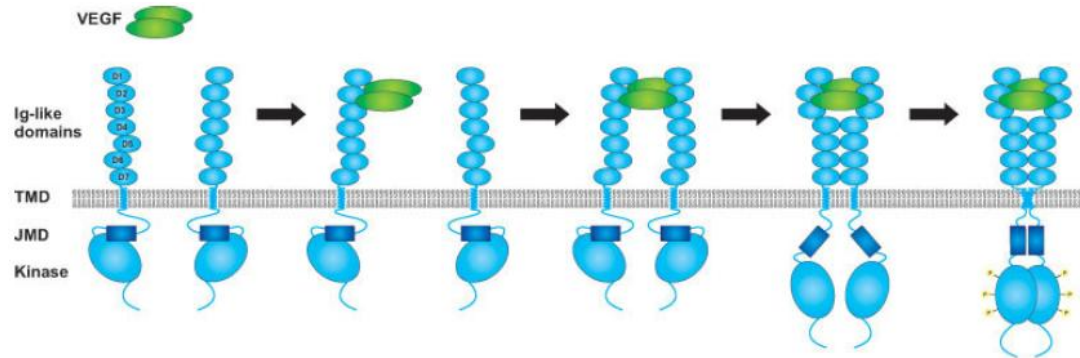
Vasküler permeabilite faktörü olarak da bilinen VEGF; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasenta büyüme faktörü (PGF)'nü de içeren sitokin ailesinin dimerik proteinli üyesidir (Ferrara, 2001). VEGF-A ilk sentezlendiğinde 232 aminoasittir. N-terminalinde 26 aminoasitlik bir sinyal dizi içerir. Olgun protein molekül içi 5 disülfid köprü, 1 glikozil grubuna sahiptir ve 206 aminoasittir (UniProt). *VEGF-B* alternatif kesip biçimle iki izoforma dönüşür (Silins vd., 1997). VEGF-B'nin kesin rolü bilinmemekle beraber inflammatör anjiogeneze rolü olduğu düşünülmektedir (Mould vd., 2003). Yapısal benzerlikleri olan VEGF-C ve VEGF-D, VEGF-A ile daha az homolojiye sahiptir (Robinson ve Stringer, 2001). Her iki büyüme faktörü de anjiogenezi uyarır (Cao vd., 1998). Ancak VEGF-C seçici olarak lenfanjiogenezi uyarır (Jeltsch vd., 1997). VEGF-E üyeleri, VEGF-A ile sadece %20-25 homolojiye sahiptir (Lyttle vd., 1994). VEGF-E etkili bir anjiogenik faktördür ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptör 2 (VEGFR-2)'yi tek başına aktive ederek anjiogenezi etkili bir şekilde uyarabilir (Meyer vd., 1999).

### 1.3.3 Reseptörleri

VEGF ailesi reseptörleri, hücre içi domeynlerinde Ig benzeri domeynler içeren sınıf V tirozin kinaz reseptörleridir. VEGF'nin üç tirozin kinaz reseptörü vardır. Bunlar VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3'tür. VEGF-A, -B ve PGF; VEGFR-1'e bağlanır. VEGF-A, -C ve -D ise VEGFR-2'ye bağlanır. VEGFR-3 VEGF-C ve -D'ye özgüdür (Stuttfield ve Ballmer-Hofer, 2009). Esasen VEGFR-1 ve VEGFR-2 kan vasküler sisteminde, VEGFR-3 ise lenfotik endoteliumda bulunur (Veikkola vd., 2000). VEGF proliferasyon ve göç üzerine etkisini en çok VEGFR-2 ile gösterir (Distler vd., 2003). VEGFR-1 ve VEGFR-2 endotel hücre proliferasyonu ve farklılaşması, vasküler permeabilite, endotelium bağımlı vazodilasyon, vasküler sürekliliği sağlayan endotel hücre apoptozunun engellenmesi, matriks sindirimini sağlayan çeşitli elemanların uyarılması, endotel hücre aktivasyonu, endotelial progenitör hücre takviyesi ve kemik iliğinden endotelial progenitör hücre mobilizasyonu gibi VEGF fonksiyonlarını düzenlerler (Ferrara vd., 1996).

### 1.3.4 Mekanizma

VEGF dimerinin reseptörüne bağlanmasıyla reseptör homo- ve heterodimerizasyonu meydana gelir. Bu bağlanma ile reseptör tirozin kinaz aktive olur ve reseptörün hücre içi domeynlerinde otofosforilasyon meydana gelir. Fosfotirozinler ve etrafındaki aminoasitler çeşitli hücre içi sinyal yollarını başlatan adaptör moleküller için bağlanma bölgeleri oluştururlar. Bu yollar hızlı yanıt gerektiren vasküler permeabilite ve endotel hücrelerin devamlılığı, göç, proliferasyon gibi gen düzenlemeleri gerektiren uzun yanıtları düzenlerler. Ligand bağlanması ayrıca transmembran domeynlerde farklı konfigürasyonların meydana gelmesini uyarır. Bu konfigürasyonlar VEGFR dimerlerinin rotasyonu ile sağlanır ve kinaz aktivitesinin tam olarak oluşmasında çok önemlidir. Reseptörlerin aktive edilmesiyle, dimerdeki bir reseptör molekülün diğer reseptör molekülü fosforillemesi sonucu, reseptörün hücre içi domeynlerinde bulunan tirozin aminoasitlerinin *trans*-fosforillenmesi meydana gelir (Şekil 1.11) (Simons vd., 2016; Stutfeld ve Ballmer-Hofer, 2009).



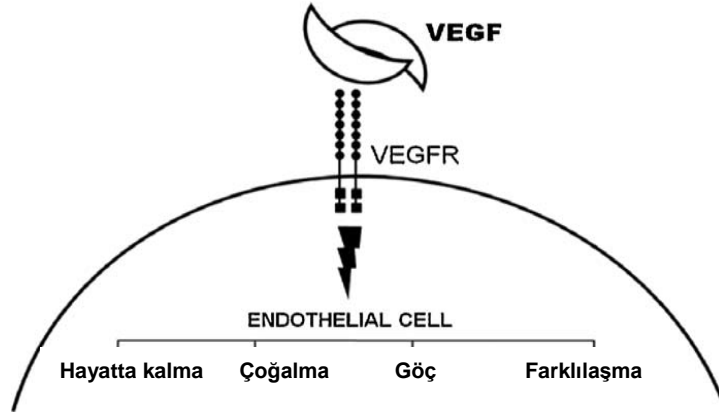
Şekil 1.11. VEGFR'lerin şematik aktivasyonu (Stutfeld ve Ballmer-Hofer, 2009)

### 1.3.5 Biyolojik etkileri

VEGF-A endotel hücrelerin proliferasyonu, tomurcuklanması ve tüp formasyonunu uyarır (Ferrara vd., 2003). Ek olarak endotelial nitrik oksit sentezini uyarır ve böylece nitrik oksit üretimini artırarak vazodilasyona neden olur (Hood vd., 1998). VEGF-A hematopoyetik kök hücreleri, monositler, osteoblastlar ve nöronlar üzerindeki birçok reseptöre bağlanır (Ferrara vd., 2003). Kemik iliği, monosit kemoatraksiyonu ve osteoblast kökenli kemik oluşumuyla hematopoyetik kök hücreleri uyarırlar (Şekil 1.12) (Ferrara vd., 2003; Storkebaum vd., 2004).



VEGF-A anjiogenez ve damar gelişiminin önemli basamaklarında ifade edilir (Jakeman vd., 1993). Farede *VEGF-A* geninin delesyonu ölümcüldür, vasküler defektler ve kardiyovasküler anormalliklerle sonuçlanır (Carmeliet vd., 1996). Yara iyileşmesi, ovulasyon, kan basıncının korunması, menstruasyon ve gebelik gibi önemli anjiogenik süreçleri etkiler (Brown vd., 1992). İnsanda, bazı hematolojik malignansiler ve hemen hemen bütün solid tümörlerde ifade edilir (Ferrara vd., 2003).

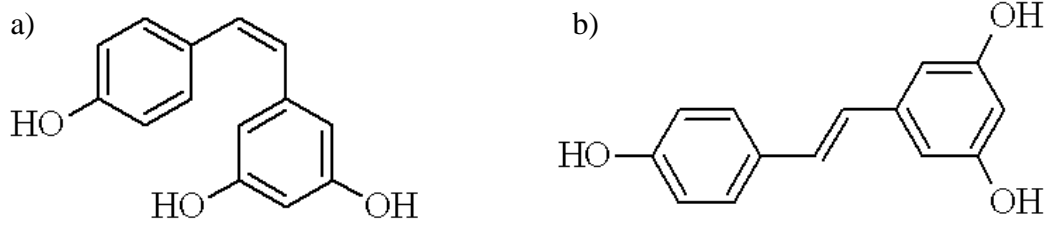


**Şekil 1.12.** Vasküler endotelial büyüme faktörünün basitleştirilmiş yolağı (Duarte vd., 2011)

#### 1.4 Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-*trans*-trihidroksistilben), fenolik bileşikler stilben ailesinin bir üyesidir. Moleküler formülü  $C_{14}H_{12}O_3$  ve moleküler ağırlığı 228.25 g/mol olan beyaz katı bir toz şeklindedir (Amri vd., 2012). Bitkilerdeki resveratrol sentaz tarafından sentezlenir (Schröder vd., 1988). *Cis* ve *trans* stereoizomerler halinde bulunur (Şekil 1.13). *Trans* formda antioksidan ve antikanser etkileri daha fazladır (Roupe vd., 2006). *Cis*-resveratrol kararlı olmadığı için ticari olarak temini mümkün değildir (Basly vd., 2000). *Trans*-resveratrol ultraviyole görünür ışığa maruz kaldığında *cis* forma dönüşür (Rodríguez vd., 2012) İlk olarak 1940'da beyaz çöpleme (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) köklerinden izole edilmiştir. 1976'da ise *Vitis vinifera*'da saptanmıştır (Langcake ve Pryce, 1976). Yaprak dokusu resveratrol'ü organizmayı fungal enfeksiyon veya ultraviyole ışığa karşı koruyucu olarak sentezler (Sielmann ve Creasy, 1992). Ayrıca iklim değişiklikleri, ozona maruz kalma ve ağır metaller gibi stres koşullarında da sentezlenir. *Polygonum cuspidatum* (Amri vd., 2012), üzüm, yer fıstığı, dutsu meyveler ve çam gibi yetmişten fazla bitki türünde tespit edilmiştir (Athar vd., 2007). Üzümde hepsinden

fazla resveratrol bulunur (Guerrero vd., 2009). Resveratrol üzümün çekirdeği ve kabuğunda bulunur fakat etli kısmında bulunmaz (Carando vd., 1999). Taze üzüm kabuğunun ıslak ağırlığının 1 gramında 50-100 µg resveratrol bulunur (Baliga vd., 2005).



**Şekil 1.13.** Resveratrolün stereoizomerleri, **a)** *cis* formu, **b)** *trans* formu

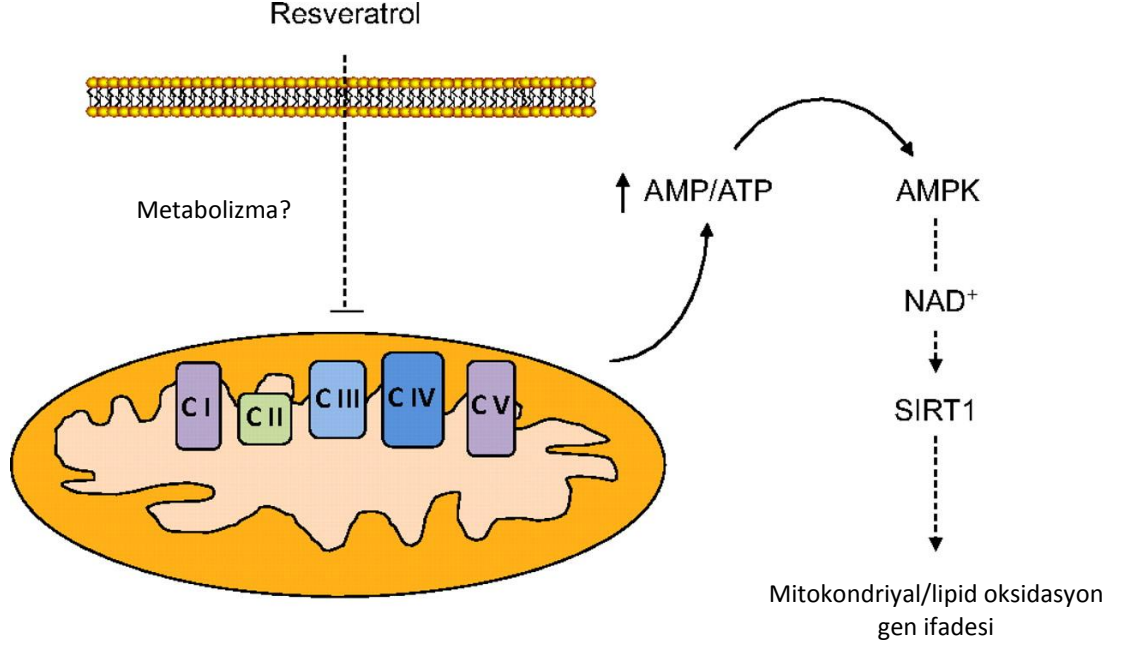
#### 1.4.1 Biyoverimliliği

Ağızda hızlı absorbe edilmesine rağmen bağırsak ve karaciğerde metabolize olması, resveratrolün biyoyararlılık oranını düşürür. Lipofilik olması suda az çözünmesine ve ağızdan alındığı zamanki biyoverimliliğinin sindirimin diğer basamaklarında korunamamasına neden olur (Das vd., 2008). Ağızda %70 oranında absorbe edilir, hepatik glukuronidasyon ve sülfasyon sonucunda oral biyoverimlilik %0.5'e düşer (Walle vd., 2004). İlaçların düşük biyoverimliliği suda az çözünmeleriyle bağlantılıdır. Resveratrolün suda çözünürlüğü 1 mg/mL'den düşüktür. Bu durum resveratrolün ilaç olarak kullanılmasında ana sorunlardan biridir (López-Nicolás ve García-Carmona, 2008). Fakat yüksek membran permabilitesi gösterir (Amidon vd., 1995). Dolaşımında albumine bağlanır. Albuminin resveratrolü taşımada ve biyoelverişliliğinde rolü olduğu düşünülmektedir (Jannin vd., 2004). Yağ asitlerinin varlığı resveratrolün albümine bağlanmasını iki kat artırır. Bunun nedeni yağ asitlerinin albuminin şeklini değiştirmesidir (Jannin vd., 2004). Yüksek dozlarda bile toksik etkisi görülmemiştir (Juan vd., 2002).

#### 1.4.2 Mekanizma

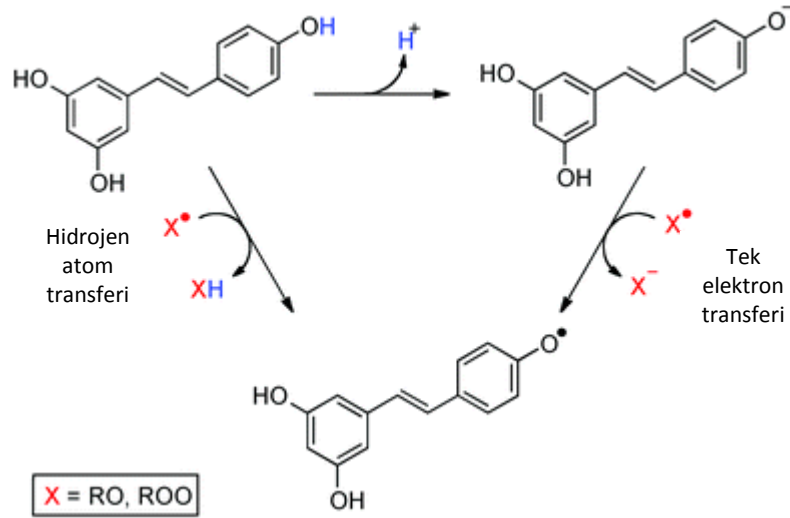
Resveratrol kalori kısıtlamasını taklit etme yeteneğini AMPK ve SIRT1'in dolaylı aktivasyonu ile gösterir. Resveratrolün SIRT1'i aktive etme mekanizmasıyla ilgili hala çelişkiler mevcuttur. Resveratrolün ATP sentaz inhibitörü olduğu

bilinmektedir. Meydana getirdiği enerji stresi AMPK'yı aktive eder, NAD<sup>+</sup> seviyesi yükselir ve SIRT1'i uyarılır. Böylece SIRT1 mitokondriyal biyogenez ve lipid oksidasyon yollarındaki hedeflerini deasetile ederek aktive eder (Şekil 1.14) (Canto ve Auwerx, 2012).



**Şekil 1.14.** Resveratrolün SIRT1'i aktive etme mekanizması. CI-V, mitokondriyal solunum kompleksleri I-V (Canto ve Auwerx, 2012)

Oksidatif stresin ana mekanizmalardan biri, lipid peroksidasyon zincirinde meydana gelen çok reaktif oksijen türlerinin oluşumudur. Resveratrol peroksil radikallerini süpürerek bu zincir reaksiyonlarını durdurur. Peroksil radikali, resveratrolün hidroksil gruplarının birinden bir hidrojen atomunu ayırır ve böylece kararlı radikal türleri oluşur. Resveratrolün bu radikal süpürme süreciyle ilgili iki mekanizma ileri sürülmüştür: bunlardan biri hidrojen atom transferi, diğeri ise tek elektron transferine dayanır (Şekil 1.15) (Rodríguez vd., 2012).



**Şekil 1.15.** Resveratrolün antioksidatif aktivitesi üzerine ileri sürülen hidrojen atom transfer ve elektron transfer mekanizmaları (Rodríguez vd., 2012)

### 1.4.3 Biyolojik etkileri

Resveratrol güçlü antioksidan, antiinflamator ve antikarsinojenik bir polifenoldür. Antioksidan aktivitesini AMPK'ları aktive ederek, reaktif oksijen türlerini engelleyerek gösterir. Böylece siklooksijenaz 2 (COX-2) ve lipid peroksidasyonunu baskılar (Szabo, 2009). Trombosit kümeleşmesini engelleyerek pıhtılaşmayı etkiler. Birçok kanser hüresinin büyümesini engeller (Athar vd., 2007). Mitojen aktive protein kinaz (MAPK)'lar, NF- $\kappa$ B ve MMP'leri içeren UV aracılı fotoyaşlanma ile ilişkili hüresel sinyal mekanizmaları üzerine etki eder (Baxter, 2008). Nitrik oksit üretimini artırarak aterosklerotik değişiklikleri engeller, okside düşük dansiteli lipoprotein seviyelerini ve lipid peroksidasyonunu azaltır (Wenzel vd., 2005), vazoaktif peptidlerin sentezini azaltır. Kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucudur (Bertelli, 2007). Beta amiloidlerin parçalanmasını sağlayarak Alzheimer'a karşı koruyucu etki gösterir (Marambaud vd., 2005). Beyinde hafıza ve öğrenme merkezlerinde aktif olan MAPK'ların sentezini artırır (Tredici vd., 1999). Östrojen reseptörüne bağlanarak perimenopozal semptomları azaltır (Calabrese, 1999) ve osteoporozu karşı koruyucudur (Su vd., 2007). Kanser başlangıcında antiapoptotik proteinleri engelleyerek apoptozu uyardığı sanılmaktadır. Ayrıca büyüme faktörü sinyal yollarını baskılayarak kanser hüresinin büyümesini ve angiogenezi baskılar (Baxter, 2008).

Kalori kısıtlamasının sirtuin genlerini aktive ederek ömür uzunluğunu artırdığı bilinmektedir. Resveratrol kalori kısıtlamasını taklit eden bilinen tek polifenoldür (Baxter, 2008). Farelerde resveratrolün ömür uzunluğuna olan etkisi diyet içeriğine bağlıdır. Resveratrol yüksek yağ diyetiyle beslenen sıçanlarda ömrün uzamasını sağlamıştır (Baur vd., 2006). Fakat normal yemle beslenen farelerde aynı etki görülmemiştir (Barger vd., 2008). Resveratrol yüksek yağ diyetinin meydana getirdiği insülin direnci, hiperglisemi ve dislipidemi gibi zararlı fizyolojik etkilere karşı koruyucudur. Resveratrol yüksek yağ diyetinin neden olduğu 153 ifade değişikliğinden 144'ünü geriletir. Bu değişiklikleri epigenetik etkilerle yapar. Resveratrolle beslenme ayrıca insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1)'in azalması, AMPK ve PGC $\alpha$  aktivitesinin artması, mitokondri sayısının artması, motor fonksiyonun gelişmesi gibi sağlıklı yaşlanmayla ilişkili yollarda değişikliklere neden olur (Baur vd., 2006). Kalp, iskelet kası ve beyni içeren birçok dokuda uzun süreli kalori kısıtlamasını taklit ederek kalori kısıtlamasının uyardığı genlerin ifade edilmesini sağlar (Barger vd., 2008). Resveratrolün bu etkileri, "Fransız Paradoksu" olarak bilinen yüksek yağlı diyetle beslenmeye rağmen, resveratrol içeren kırmızı şarap tüketiminin kronik kalp hastalığının neden olduğu ölüm oranlarını nasıl düşürdüğünü açıklamaktadır (Renaud ve de Lorgeril, 1992).

## 1.5 Anjiogenez

Kan damarları ve aktif akış modeli, ilk olarak 17. yüzyılda Harvey ve Malpighi tarafından tanımlanmıştır. Judah Folkman ise 1971'de anjiogenezini açıklamıştır (Costa vd., 2004). Anjiogenez terimi çoğunlukla damar büyüme sürecini belirtmek için kullanılır. Fakat anjiogenez önceden var olan damarlardan yeni damarların oluşumudur (Zygmunt vd., 2003). Bu yolla hücrelere oksijen ve besin sağlanır, atık ürünler uzaklaştırılır (Carmeliet, 2003). Anjiogenez sadece fizyolojik durumlarda önemli olan bir süreç değildir. Aynı zamanda kanser, diyabetik retinopati ve romatoid artrit gibi çeşitli hastalıklarda da önemlidir (Risau, 1997). Yeni kan damarlarının oluşumunda zorunlu bir süreçtir (Folkman, 1992). Gelişim, üreme ve yara iyileşmesinde çok önemlidir. Anjiogenez, büyük ölçüde düzenlenen bir süreçtir; kısa dönemlerde aktive edilir ve sonra tamamen engellenir (Folkman, 2006).

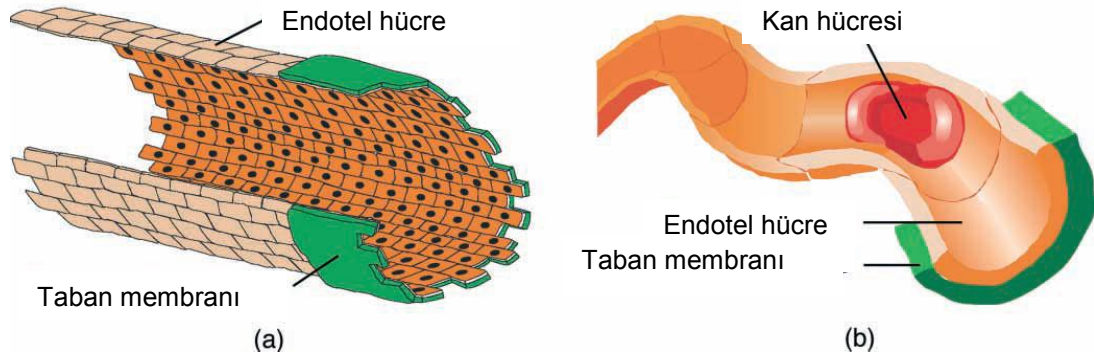
Anjiogenik anahtar; anjiogenik ve anjiostatik faktörler arasındaki dengeyi ifade eden bir terimdir. Bu dengenin bozulması, kan damarlarının aşırı çoğalması ile karakterize olan çok sayıdaki hastalığa neden olur (Ferrara vd., 2003). Bu hastalıklar

arasında hipertansiyon (Zarei vd., 2011), kanserler, sedef hastalığı, artrit, diyabet (Amjadi vd., 2011), obezite, astım ve ateroskleroz bulunmaktadır. Ek olarak, anjiogenezdeki herhangi bir sorun kalp ve beyinde iskemi, nörodejenerasyon, hipertansiyon, osteoporoz, solunum güçlüğü, preeklampsi, endometriyozis, postpartum kardiyomiyopati ve ovarian hiperstimulasyon sendromuna neden olabilir (Carmeliet, 2003).

### **1.5.1 Endotelyum**

Kan damarlarının en önemli bileşeni endotel hücrelerdir. Aortadan en küçük kapillerlere kadar her damar endotelyum adı verilen tek tabakalı endotel hücrelerden oluşur. Bu hücreler kan akışı boyunca merkezi lümeni saran mozaik bir yapı oluştururlar (Şekil 1.16a). En küçük damarlar, lümeni oluşturan tek tabakalı endotel hücreden oluşabilir (Şekil 1.16b). Endotelyum besin, beyaz kan hücreleri ve diğer maddelerin kan akışı ve dokular arasındaki geçişini kontrol eder. Endotelyumun dışında taban membranı adı verilen ekstraselüler bir astar bulunur. Bu membran, endotel hücreleri etraftaki bağlayıcı dokudan ayırır (Plank ve Sleeman, 2003). Özellikle laminin ve kollajen protein fibrillerinden oluşur (Reynolds vd., 2000) ve periendotelyal destek hücrelerini içerebilir. Bunlar kapillerdeki perisitler ve daha büyük damarlardaki düz kas hücreleridir. Taban membranı, üzerinde endotel hücrelerin bulunduğu bir iskelet yapı olarak görev yapar ve endotelyumun kararlı durumunun devam etmesini sağlar (Paweletz ve Knierim, 1989). Kadherinler ve integrinler gibi adhezyon molekülleri tarafından düzenlenen hücre-hücre ve hücre-taban membran bağlantıları, son derece önemlidir. Birinin veya her ikisinin kaybı endotelyum ve endotel hücre apoptozunun kararsız hale gelmesine yol açabilir (Lobov vd., 2002). Periendotelyal hücreler kan damarlarının kararlı durumunun sürdürülmesinde özellikle önemli bir rol oynarlar ve kan akışının düzenlenmesine katkı sağlarlar (Hirschi ve D'Amore, 1996).

Bir organın fonksiyonel dokusundan, yani parenkiminden, damarı ayıran tabaka, bir konnektif doku olan stroma, stromal hücrelerden, özellikle kollajen ve fibronektin gibi ekstraselüler protein fibrilleri içeren matriksi salgılayan fibroblastlardan oluşur (Alberts vd., 1994).



**Şekil 1.16.** Endotelyum, **a)** Geniş damar, **b)** Kapiller (Plank ve Sleeman, 2003)

### 1.5.2 Biyolojik anjiogenez süreci

Embriyoda ilk damarlar vaskülojeniz denilen aşamayla *de novo* oluşur (Şekil 1.17a). Anjiogenez üç aşamadan meydana gelir: ilk aşama anjiogenik genişlemeyi başlatan kapiller içindeki uç hücreleri adını alan bazı endotel hücrelerin seçimidir. Bu hücreler anjiogenik faktör VEGF-A ile reaksiyona girerler. Bu nedenle VEGF-A, uç hücrelerinin invazyon ve göçünü tetikler. Uç hücrelerinin seçimi Notch ailesi reseptörleri (heterodimerik proteinler) ve transmembran ligandları tarafından kontrol edilir (Sainson vd., 2005). Endotel hücrelerin uç ve gövde hücrelerine farklılaşması Notch yolağı tarafından kontrol edilir (Eilken ve Adams, 2010). Notch aktivitesi, gövde hücrelerinde yüksek, uç hücrelerinde düşüktür (Thurston vd., 2007). VEGF-A'nın sonraki işlevi, VEGF-A-VEGFR-2 etkileşimi tarafından düzenlenen VEGF-A gradienti meydana getirerek uç hücrelerinin yönelimini sağlamaktır (Gerhardt vd., 2003).

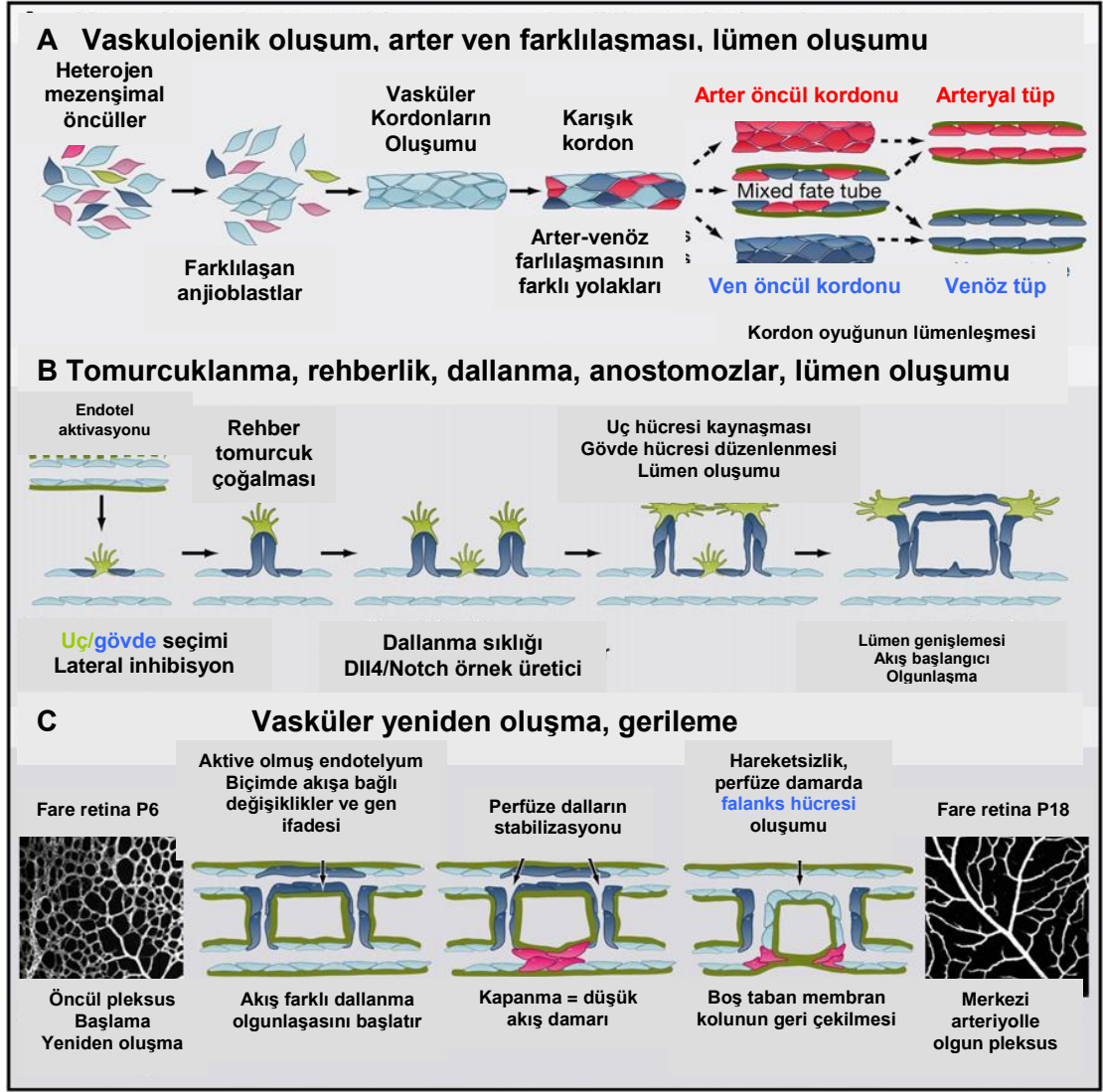
Proanjiogenik sinyaller tarafından çekilen endotel hücreler hareketli ve invaziv hale gelirler ve filopod çıkıntı oluştururlar (Şekil 1.17b) (Potente vd., 2011). Filopodlar, sıkı demetler halinde düzenlenmiş, uzun ve paralel aktin filamentlerini içeren membran çıkıntılarıdır. Bu özel yapılar hareketli uyarının sensörleri olarak davranırlar (Lamalice vd., 2007). İkinci aşama göç, endotel hücrelerinin çoğalması ve tüp oluşumudur. Bu durum VEGF-A ve VEGFR-2 etkileşimi ile düzenlenir (Gerhardt vd., 2003). Uç hücreleri yeni tomurcukların oluşmasında öncülük ederler ve rehber sinyaller doğrultusunda ortamı parçalarlar. Uç hücrelerini izleyen gövde hücreler daha az filopod uzatırlar. Gövde hücreler bir lümen oluştururlar ve tomurcuk uzamasını desteklemek üzere çoğalırlar. Uç hücreleri, komşu tomurcuklardaki hücrelerle anastomoz yaparak damar loplarnı oluştururlar (Potente vd., 2011).

Üçüncü aşama endotel çoğalması ve yeni kapillerlerin göçünün engellenmesi, yeni oluşan vasküler tüplerin stabilitesi (yeni oluşan damarların diğerleriyle birleşmesi), duvar hücrelerinin (perisitler ve vasküler düz kas hücreleri) görevlerini yapan yeni oluşmuş damarların olgunlaşmasıdır (Cleaver ve Melton, 2003). Kan akışının başlaması, taban membranının oluşumu ve duvar hücrelerinin güçlendirilmesi yeni bağlantıları sağlamlaştırır. Tomurcuklanma süreci proanjiogenik sinyaller azalana kadar yinelenir ve stabilite yeniden oluşturulur (Şekil 1.17c) (Potente vd., 2011). Perisitler kapiller duvarları oluşturmak üzere endotel hücrelerle doğrudan temas halindedir (Baluk vd., 2005). Yeni oluşan damarların duvarlarının oluşumunda perisitlerin işlevi, çoğunlukla trombosit kökenli büyüme faktör- $\beta$  (PDGF- $\beta$ ) ve reseptörü trombosit kökenli büyüme faktör- $\beta$  reseptör (PDGFR-  $\beta$ ) aracılığıyla düzenlenir (Betsholtz, 2004). VEGFR reseptörleri gibi PDGFR'ler de hücre içi bölgelerinde tirozin kinaz domeyni içeren transmembran proteinleridir (Fredriksson vd., 2004).

Endotel ve duvar hücreleri, endotel tübüllerin etrafındaki ekstraselüler matriks proteinlerinden oluşan bir taban membranını paylaşırlar (Eble ve Niland, 2009). Bu taban membranı ve duvar hücrelerinin örtüsü, endotel hücrelerin yerlerini korumasını sağlarlar. Tomurcuklanmanın başlangıcında, bu nedenle endotel hücreler serbest hale getirilmeli ve taban membranının proteolitik yıkımı ve duvar hücrelerinden ayrılmalıdır. Taban membranı yıkımı, uç hücrelerinde bolca bulunan MMP'ler tarafından sağlanır (Blasi ve Carmeliet, 2002).

Hücresinin hareketi, taksis adı verilen iç uyarana cevap olarak gerçekleşir. Endotel hücre göçü üç ana mekanizmayı içerir: kemotaksis, çözünür kemoatraktant gradientine doğru yönelmiş göç; haptotaksis, hareketsiz ligand gradientine doğru yönelmiş göç; mekanotaksis, mekanik kuvvetler tarafından üretilen yönelmiş göç (Li vd., 2005). Anjiogenez esnasında endotel hücre göçü, bu üç mekanizmanın birleşmiş bir sonucudur. Tipik olarak endotel hücrelerin kemotaksisi VEGF ve bazal fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi büyüme faktörleri tarafından yönlendirilir. Kan damarlarının iç yüzünde bulunmalarından dolayı endotel hücreler sürekli olarak göç yollarının aktivasyonunda payı olan kesme stresi ile temas halindedirler. Bu nedenle, akışkan kesme stresinin mekanotaksisi başlattığı ve ön uçta genişleme, matrikse adhezyon, arkadaki adhezyonların salınımını içeren çeşitli göç basamaklarını ayarladığına dair kanıtlar bulunmaktadır (Li vd., 2005).





**Şekil 1.17.** Damar oluşumunun aşamaları, a) Anjioblastların endotel hücrelere farklılaşması, b) Damar tomurcuklanma basamakları, c) Bir öncülden damar oluşumunun sıralı basamakları (Potente vd., 2011)

### 1.5.3 Anjiogenik faktörler

Anjiogenik faktörler ve inhibitörler son on yılda keşfedilmiştir. Özgül anjiogenik moleküller anjiogenezi başlatır ve özgül inhibitör moleküller ise durdururlar (Çizelge 1.2). Sayısız anjiogenezi uyarıcı bulunur. Bunların arasında VEGF ailesi, anjiopietinler, transform edici büyüme faktörleri (TGF), PDGF, TNF- $\alpha$ , interlökinler ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) ailesi bulunur (Papetti ve Herman, 2002; Presta vd., 2005). Ek olarak, çözümlü büyüme faktörleri, membrana bağlı proteinler, hücre-matriks, hücre-hücre etkileşimleri ve birçok etkileşim sistemleri faktörleri anjiogenezi kontrol eder ve etkiler (Papetti ve Herman, 2002; Plank ve Sleeman, 2003).

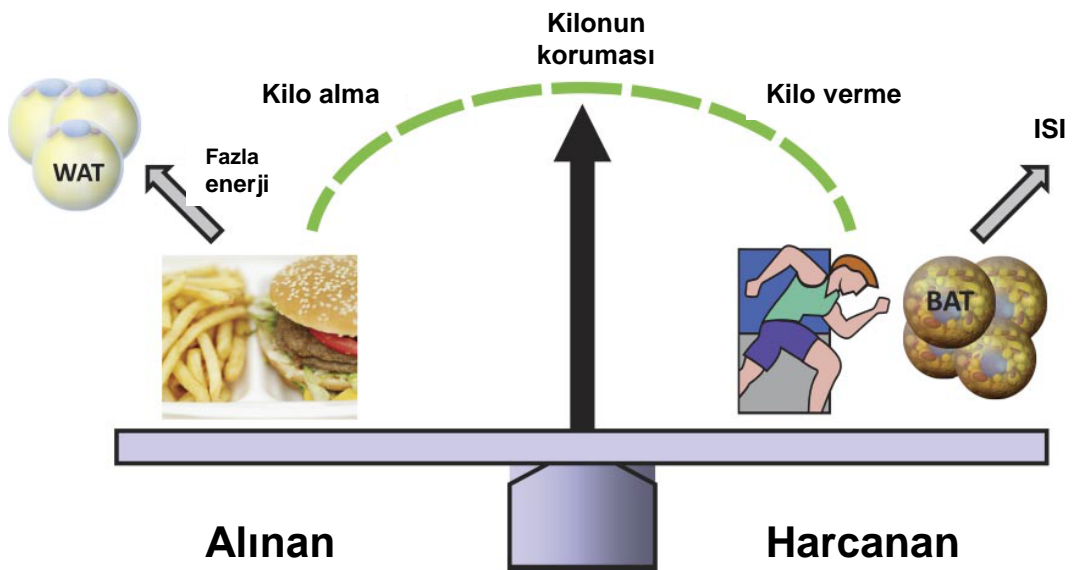
**Çizelge 1.2.** Anjiogenik aktivite ve inhibitörler (Plank ve Sleeman, 2003)

<b>Faktör</b>	<b>İfade</b>	<b>Aktive edici etkileri</b>	<b>İnhibe edici etkileri</b>
Anjiopietin-1 (Ang-1)	Büyük ölçüde normal dokuda (perisitler tarafından) ve tümör dokusunda (tümör hücreleri tarafından) ifade edilir	Endotel hücre tüp oluşumunun uyarılması; endotel hücre apoptozunun engellenmesi; endotel hücre kemoatraktantı	Pasif endotelyumun sürdürülmesi
Anjiopietin-2 (Ang-2)	Endotel hücreleri tarafından salgılanır	Hücre-hücre ve hücre-matriks kontaklarının kaybı	Ang-1 yolu sinyalinin engellenmesi
Anjiostatin	Plazminojen proteolizinin ürünleri yoluyla salgılanır		Endotel hücre göçü, çoğalması, proteoliz ve tüp oluşumunun engellenmesi
Bazal fibroblast büyüme faktörü (bFGF)	Büyük ölçüde normal doku ve tümör dokusunda ifade edilir	Endotel hücre kemotaksisi, çoğalması ve PA ifadesinin uyarılması	
Endostatin	Kollajen proteolizinin ürünleri yoluyla salgılanır		Endotel hücre göçü, çoğalması ve tüp oluşumunun engellenmesi
İnterferon- $\alpha/\beta$ , İnterlökinler (IF- $\alpha/\beta$ , IL)	İmmün hücreler tarafından sentezlenir		Endotel hücre göçü ve çoğalmasının engellenmesi; VEGF ve bFGF'nin azaltılması
Matriks metalloproteinazlar (MMP)	Tümör hücreleri ve aktive edilmiş endotel hücreler tarafından salgılanır	Taban membranı ve endotel hücre membranının yıkılması, hücre göçünün kolaylaştırılması	Anjiostatin/endostatin üretilmesi
Plazminojen aktivatörler (PA)	Aktive edilmiş endotel hücre tarafından salgılanır	Plazmin içindeki plazminojenin aktivasyonu	Anjiostatin/endostatin üretilmesi
Plazminojen aktivatör inhibitör (PAI)	Fibroblastlar ve aktive edilmiş endotel hücreler tarafından salgılanır	Anjiostatin üretiminin engellenmesi; aşırı proteolize karşı koruma	PA'nın oluşturduğu proteoliz ve endotel hücre göçünün engellenmesi
Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF)	Trombosit, aktive edilmiş endotel hücre ve makrofajlar tarafından salgılanır	Endotel hücre ipliği oluşumunun uyarılması; düz kas hücresi ve perisitlerin güçlendirilmesi	
Plazmin	Plazminojenin PA tarafından aktivasyonu ile oluşur	Taban membranı ve endotel hücre membranının yıkılması, hücre göçünün kolaylaştırılması	Anjiostatin/endostatin üretilmesi
Transform edici büyüme faktör- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	Büyük ölçüde normal doku ve tümör dokusunda ifade edilir; plazmin tarafından aktive edilir	Endotel hücre kordonu, PA ifadesi ve endotel hücre sentezinin uyarılması	Endotel hücre göçü ve çoğalmasının engellenmesi; PAI ifadesinin uyarılması
Metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP)	Normal dokuda bulunur	Anjiostatin üretiminin engellenmesi	MMP'ler ve endotel hücre göçünün oluşturduğu proteolizin engellenmesi
Tümör nekroz faktör $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Aktive edilmiş makrofajlar tarafından salgılanır	Endotel hücre ipliği oluşumunun uyarılması	Endotel hücre göçü ve çoğalmasının engellenmesi
Trombospondin-1 (TSP-1)	Fibroblastlar, endotel hücreler, düz kas hücreleri, makrofajlar ve tümör hücreleri tarafından salgılanır		Endotel hücre göçü, çoğalması, tüp oluşumu ve endotel hücre membranı sentezinin engellenmesi
Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)	Hipoksik tümör hücreleri ve makrofajlar tarafından salgılanır	Endotel hücre kemotaksisi, çoğalması, proteaz ifadesi, devamlılığı, farklılaşması ve geçirgenliğinin uyarılması	

## 1.6 Adipoz Doku

Adipoz doku enerji metabolizması, glikoz ve lipid metabolizması, hücre canlılığı, beslenme kontrolü, termogenez, nöroendokrin işlev, üreme, immünite ve kardiyovasküler işlevde önemli görevleri olan adipokinler, serbest yağ asitleri ve steroid hormonlar gibi molekülleri sentezleyen en büyük endokrin organdır (Miao ve Li, 2012). Bu nedenle adiposit biyolojisini anlamak, obezite ve tip 2 diyabet gibi metabolik hastalıkların patofizyolojisini anlamada çok önemlidir. Vücuttaki yağın neredeyse %95'i adipoz dokudadır, geri kalan kısmı kas, karaciğer ve pankreasta bulunur (Jocken ve Blaak, 2008). Adipoz doku bol miktarda sempatik sinir lifleriyle donatılmıştır. Bu sinirlerin aktive edilmesi lipolizi artırır (Rosen ve Spiegelman, 2006).

Vücutta morfolojik ve fonksiyonel olarak farklı iki tip adipoz doku bulunur. Beyaz yağ doku (white adipose tissue, WAT, BYD) fazla enerjinin depolanmasında; kahverengi yağ doku (brown adipose tissue, BAT, KYD) ise titremesiz termogenezde rol oynar (Şekil 1.18) (Miao ve Li, 2012).



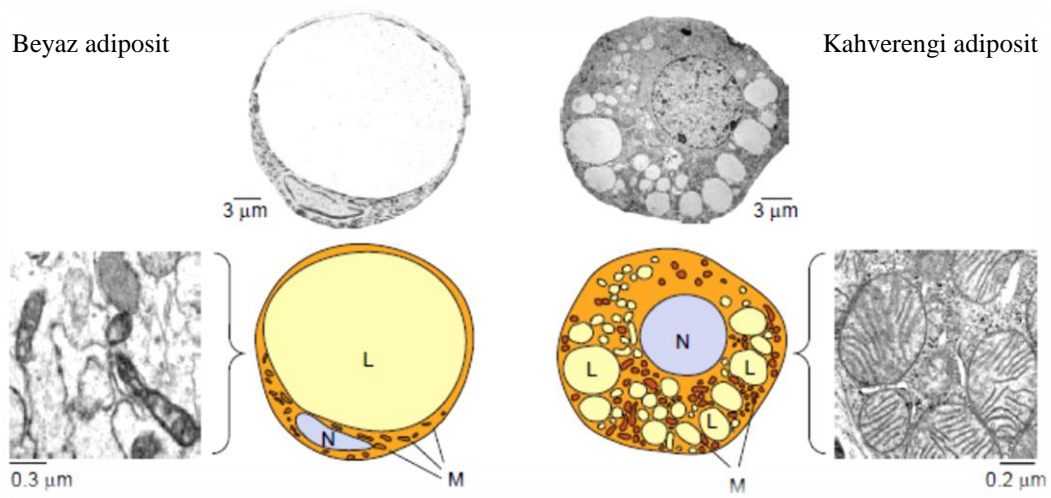
Şekil 1.18. Yağ dokusu çeşitleri ve görevleri (Seale ve Lazar, 2009)

### 1.6.1 Beyaz yağ doku

BYD vücutta enerji deposu olarak görev yapar (Langin, 2006). Ek olarak açlık ve tokluğu düzenleyen hormonları üreten büyük bir endokrin organdır (Rosen ve Spiegelman, 2006). Triaçilgliseroller adipositlerde depolanırlar. Vücut enerjiye ihtiyaç duyduğunda hidroliz edilirler ve yağ asitleri olarak dolaşıma verilirler

(Langin, 2006). BYD önce önemsiz bir organ olarak görülmüştür. Fakat sonra oldukça aktif ve birçok fonksiyona sahip olduğu, diğer dokularla iletişim halinde bulunduğu, büyük plastisiteye sahip, iç uyaranlara ve enerji dengesindeki değişikliklere adapte olduğu bulunmuştur (Frühbeck vd., 2009).

Beyaz yağ hücreleri genellikle büyük, yuvarlak hücrelerdir. Hücrenin büyük bir kısmını uniloküler lipid damlacığı kapladığından, nükleus düz veya yarım ay şeklinde kenara itilmiştir. Sitoplazma ise kenarda ince uzamış haldedir (Şekil 1.19, 1.20, Çizelge 1.3) (Frühbeck vd., 2009). Beyaz yağ dokusu ısı yalıtımı ve mekanik destek sağlar (Frühbeck vd., 2009; Rosen ve Spiegelman, 2006).



**Şekil 1.19.** Beyaz ve kahverengi adiposit morfolojisi arasındaki farkın şematik ve transmisyon mikroskop görüntüsü. L, lipid; M, mitokondri; N, nükleus (Villarroya vd., 2005)

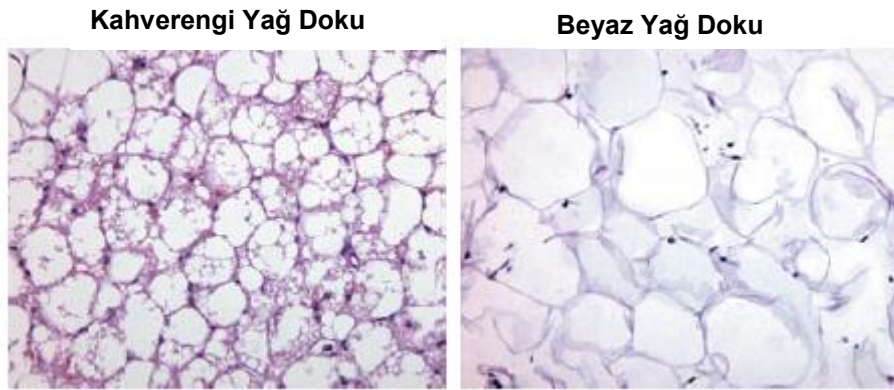
Keşfedilen ilk adipokin leptindir. Leptin besin alımını azaltıp enerji tüketimini artırarak bir yağ doku dengeleyicisi olarak görev yapar. Bir diğer adipokin olan adinopektinin dolaşımdaki seviyeleri, diğer adipokinlerin tersine, vücut kütlesiyle ters orantılıdır (Rosen ve Spiegelman, 2006).

### 1.6.2 Kahverengi yağ doku

KYD soğuk ve aşırı beslenmeye karşı korunmada kimyasal enerjiyi ısı enerjisine dönüştüren oldukça özelleşmiş bir dokudur. Memelileri hipotermiden korumak üzere ısı üretmek amacıyla evrimleşmiştir. Özellikle kış uykusu esnasında, küçük memeli hayvanlarda ve yeni doğanlarda yüzey/hacim oranı büyük olduğu için titremesiz termogenez çok önemlidir (Kajimura ve Saito, 2014). KYD'yi BYD'den

ayırır en önemli fark eşleşmeme protein 1 (UCP1) ifade etmesidir (Rosen ve Spiegelman, 2006). KYD kemirgenlerde öncelikle interskapular bölge ve aksillada, daha az miktarlarda timusun yanında, toraks ve abdomenin dorsal orta hattında bulunur ve ömür boyu aktiftir. İnsan yeni doğanında ise boyun, mediastinum, büyük damarların ve böbreklerin etrafında bulur. (Frühbeck vd., 2009). İnsanlarda doğumdan sonra küçülmeye başladığı ve doğumdan bir yıl sonra kaybolduğu düşünülmüştür. Fakat pozitron emisyon tomografi (PET) aracılığıyla soğuğa maruz kalma ve sempatik sinir sistemi aktivasyonu ile uyarılabileceği kanıtlanmıştır (Nedergaard vd., 2007). Feokromasitoma, adrenal medulladan köken alan ve nöradrenalin salgılayan bir tümördür. Hibernoma ise KYD'nin iyi huylu tümörüdür. Bu tümörlerin bulunduğu insanlarda da KYD'nin aktif olduğu görülmüştür (Nedergaard vd., 2007).

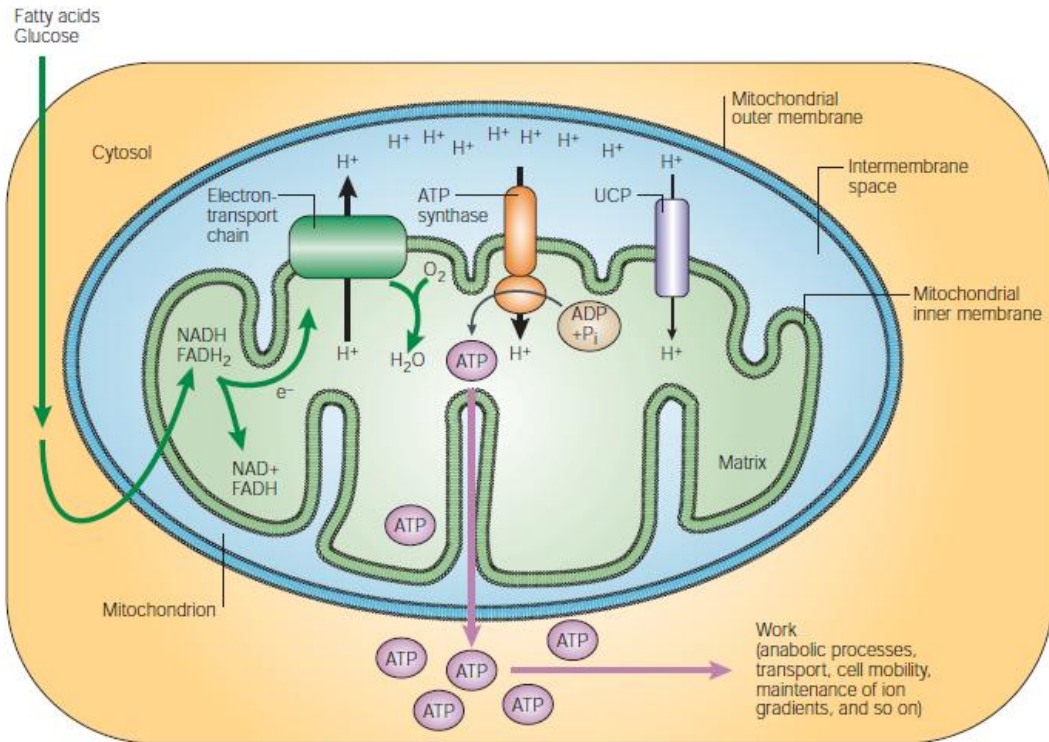
KYD'nin yağ hücrelerinde multiloküler lipid damlacıkları bulunur ve enerji elde edilmesinde yakıt deposu olarak görev yapar. Çok miktardaki mitokondriler, KYD'ye karakteristik kahverengini verir (Şekil 1.19, 1.20) (Cannon ve Nedergaard, 2004). Kahverengi yağ hücreleri, beyaz hücrelerine nazaran daha küçük çaplı ve hacimlidir. Daha büyük oval veya yuvarlak nükleusları ve bol miktarda sitoplazması bulunur (Frühbeck vd., 2009). KYD, BYD'den daha fazla damar ve noradrenerjik sinirler içerir. BYD kronik soğuğa maruz kaldığında KYD'ye dönüşebilir, obeziteye yol açan diyet ise KYD'nin BYD'ye dönüşmesine neden olabilir (Miao ve Li, 2012).



**Şekil 1.20.** Kahverengi ve beyaz yağ dokular (van Marken Lichtenbelt vd., 2009)

Mitokondri iç zarında gerçekleşen oksidatif fosforilasyonda, protonlar iç membran bölgesine aktarılır. Böylece bir elektrokimyasal gradient meydana getirilir. Protonların mitokondriyal matrikse geri dönüşleri esnasında ATP sentaz aracılığıyla ATP sentezi gerçekleşir. Gıda yıkımı ile ATP yapımı arasındaki bu ilişkiye coupling

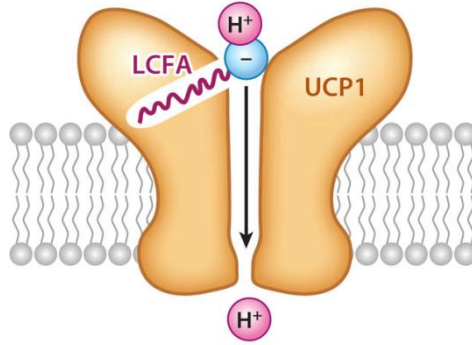
(eşleşme) ve bu reaksiyona da eşleşmeli oksidatif fosforilasyon adı verilmektedir. Kahverengi adipositlerin ATP sentez kapasiteleri oldukça düşüktür (Kajimura ve Saito, 2014; Krauss vd., 2005). KYD mitokondrilerinin iç zarında bulunan eşleşme protein-1 (uncoupling protein-1, UCP1) bu gradienti bozar ve protonlar bu kanal aracılığı ile tekrar matrikse geçerler. Böylece yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda ATP yerine ısı meydana gelir (Şekil 1.21) (Frühbeck vd., 2009; Krauss vd., 2005; Rosen ve Spiegelman, 2006).



**Şekil 1.21.** Memeli hücrelerinde termogenez ve oksidatif fosforilasyon, yeşil oklar elektron ( $e^-$ ) kaynakları glukoz ve serbest yağ asitlerini göstermektedir (Krauss vd., 2005)

Diğer UCP üyeleri olan UCP2 ve UCP3, UCP1 ile aynı yapısal homolojiyi paylaşırlar. Fakat adaptif termogenezde herhangi bir rolleri yoktur (Golozoubova vd., 2001). Soğuğa maruz kalma ve sempatik sinir sistemi aktivasyonu ile *Ucp1* ifadesi ve protein seviyeleri hızla artar (Frühbeck vd., 2009). KYD gelişimi ve fonksiyonları  $\beta$ -adrenoreseptör ( $\beta$ -AR) sinyal yolu tarafından kontrol edilir.  $\beta$ -AR'lerden ( $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -,  $\beta_3$ -AR)  $\beta_1$ -AR kahverengi adiposit öncüllerinin proliferasyonu için önemlidir.  $\beta_3$ -AR ise olgun kahverengi adipositlerin termojenik işlevinde önemli bir rol oynar (Bronnikov vd., 1992). UCP1'in aktivitesi pürin di- ve trifosfat nükleotitler, özellikle

de ATP tarafından baskılanır. ATP, UCP1'in sitozolik tarafına bağlanarak proton transportunu engeller. Buna karşılık aşırı beslenme ve soğuğa maruz kalmanın son ürünü olan serbest yağ asitleri UCP1'in bilinen aktivatörleridir. Çünkü UCP1 bir yağ asidi anyon/H<sup>+</sup> simporterdir (Şekil 1.22) (Kajimura ve Saito, 2014).



**Şekil 1.22.** UCP1-bağımlı termogenezin teorik gösterimi, LCFA, uzun zincir yağ asiti (Kajimura ve Saito, 2014)

Havalandırma ve kalorifer sistemleri termoregülatör mekanizmalara olan ihtiyacı azalttığından dolayı KYD'nin miktarında azalmalara neden oldu. Fakat soğuğa maruz kalma, KYD'yi tekrar aktive eder. Örneğin Kuzey Avrupa'da dışarıda çalışan işçilerde KYD aktiftir (Huttunen vd., 1981) Yapılan çalışmalar fazla kilolu ve obez kişilerin KYD aktivitesinin, zayıf kişilere göre daha düşük olduğunu gösterdi (van Marken Lichtenbelt vd., 2009). Yüksek oranlardaki KYD'nin ilerleyen yaşlarda ortaya çıkan obeziteye karşı koruyucu olduğu gözlemlendi (Cypess vd., 2009). KYD'nin fonksiyonunun artırılması veya BYD'de kahverengi adiposit benzeri genlerin uyarılması, obeziteye karşı dirençle uyum göstermektedir (Cannon ve Nedergaard, 2004).

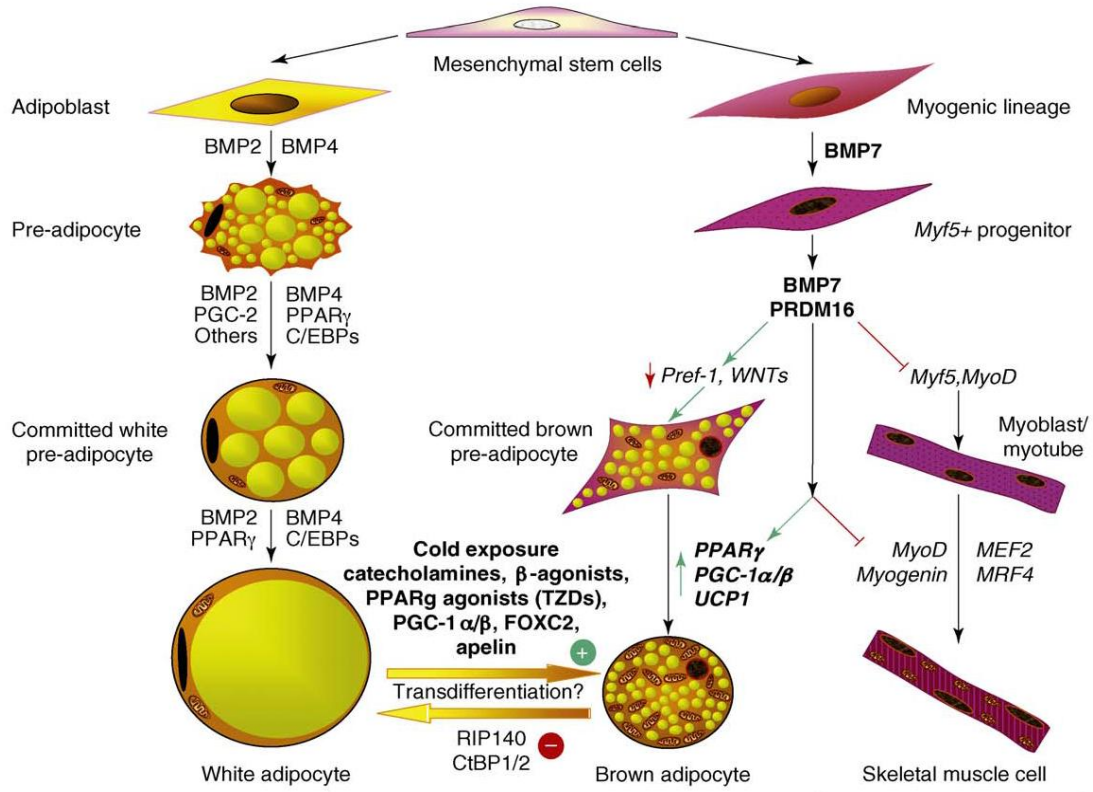
**Çizelge 1.3.** BYD ve KYD arasındaki farklar (Frühbeck vd., 2009)

Özellik	BYD	KYD
<b>İşlevsel özellikler</b>		
Enerji homeostazisi ile ilgili fizyolojik süreçteki görevi	Triaçilgliserol formunda önemli enerji depolama kapasitesi;	Termogenez, mitokondriyal biyogenez ve oksidatif fosforilasyonda görev alma;
	Yağ asiti ve gliserol salımı;	Daha düşük yağ depolama kapasitesi;
	Lipoliz ve lipogenez;	Daha düşük adipokin ve diğer adipoz kaynaklı faktör salgılama;
	Adipogenez; Aşırı miktarda adipokin ve büyüme faktörü salgılama;	
<b>Makroskopik özellikler</b>		
Ana depo yerleşimi	Subkutan abdominal, perirenal, inguinal, gonadal ve retroperitoneal	İnterskapular, paravertebral, aksillar ve perineal
Renk	Beyaz (büyük oranda değişken, parlak fildişinden koyu sarı renk aralığında)	Kahverengi (parlak pembeden koyu kırmızı tonlarına değişken)
Damarlanma	Yeterli damarlanma (++)	Hem kan akışı, hem de damar sayısı olarak aşırı bol damarlanma (++++)
İnnervasyon	Ağırlıklı olarak sempatik (++) fakat parasempatik (+) kanıtlar da mevcut	Sempatik sinir sistemi (++++)
Doku organizasyonu	Yoğun biçimde paketlenmiş hücrelerin küçük lobları	Bez benzeri yapıyla lobuler organizasyon
<b>Mikroskopik özellikler</b>		
Adiposit		
Şekil	Çok düzlemliden küresele değişken	Ağırlıklı olarak çokgen
Boyut	Oldukça değişken, ~25 µm'den 200 µm'ye kadar (hacmini 1000 kat arttırma olasılığı)	Nispeten daha küçük (15-60 µm arası)
Nukleus	Hücre hacminin %2-3'ünü kaplayan periferik yarım, düz veya fincan şeklinde	Merkezde yerleşik ağırlıklı olarak yuvarlak veya oval şekilli
Lipid damlacıkları	Hücre hacminin %90'ını kaplayan büyük bir çoğunlukla tek büyük lipid damlacığı içeren ünilocüler	Bol küçük lipid damlacığı içeren tipik multilocüler
Sitoplazma	Dar periferik kenar içinde ince uzamış	Hücre etrafında düzensiz bir şekilde uzamış fazla hacim
Mitokondri	Az, küçük, uzun	Bol, büyük, yuvarlak
Endoplazmik retikulum (ER)	Granüllü ER'de aralıklı sisternalar	Az gelişmiş ER
Çok hücrelilik	Çok miktarda diğer hücre tipleri (++++), örneğin fibroblastlar, immün hücreler	Çok az miktarda diğer hücre tipleri (+/-)
<b>Ana moleküler özellikler</b>		
UCP	UCP1 (-), UCP2 (++)	UCP1 (++++), UCP2 (+), UCP3
α/β Adrenoreseptör	β <sub>3</sub> -AR (+), β <sub>1</sub> -AR (++) , α <sub>1/2</sub> -AR (+)	β <sub>3</sub> -AR (++++), β <sub>1</sub> -AR (+), α <sub>1/2</sub> -AR (+)
PGC-1	Düşük (+)	Yüksek (+++)
PRDM16	Düşük (+)	Yüksek (+++)
CIDEA	Düşük (-)	Yüksek (+++)
Sitokrom c	Düşük (+)	Yüksek (+++)
RIP140	Yüksek (+++)	Düşük (-)
Hox genleri	A1 (-), C4 (-)	A4 (++++), C4 (++++)
Deiodinaz tip II	Düşük (+)	Yüksek (+++)
Leptin	Yüksek (+++)	Doğumda var, yetişkinlikte yok



### 1.6.3 Adipogenez

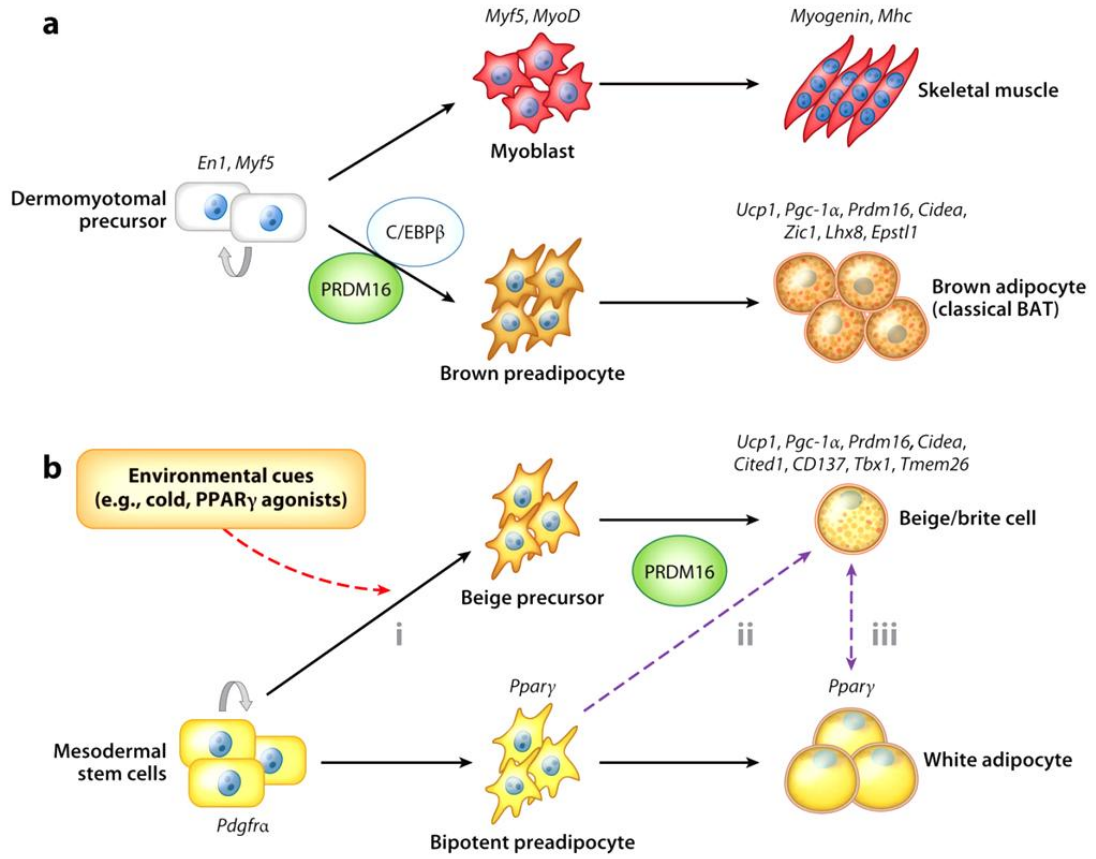
Embriyoda beyaz ve kahverengi adipositler mezenşimal öncüllerden köken alırlar (Frühbeck vd., 2009). Adipogenez başlatan faktör fibroblastlarda veya mezenşimal hücrelerde ifade edilen PPAR $\gamma$ 'dır (Kajimura ve Saito, 2014; Rosen ve Spiegelman, 2006). Miyojenik faktör 5 (*Myf5*) ifade eden öncüller miyositler ve kahverengi adipositlere, ifade etmeyen hücreler ise beyaz adipositleri oluşturacak olan adipoblastlara farklılaşırlar. Her iki tür adipositin oluşumunda birçok faktör etki eder (Frühbeck vd., 2009). CCAAT/enhansır bağlanma proteini (C/EBP), öncüllerin beyaz adipositlere farklılaşmasını sağlayan en önemli molekül olarak kabul edilir (Rosen ve MacDougald, 2006) Kemik morfojenik protein 2 (BMP2) ve BMP4 mezenşimal öncül hücrelerin beyaz adipositlere farklılaşmasını sağlarken, BMP7 ise kahverengi adipositlere farklılaşmasını sağlar. BMP7, kahverengi preadipositleri baskılayan preadiposit faktör 1 (*Pref-1*) ve embriyolojik gelişimde görev yapan WNT'ler gibi erken adipogenik inhibitörleri baskılar. Aynı zamanda kahverengi adipogenezini aktive eden anahtar molekül PR domain içeren 16 (PRDM16)'yı uyarır ve öncüllerin iskelet kasına farklılaşmasını sağlayan *Myf5* ve miyogenik farklılaşma (*MyoD*) gibi miyotüpe özgü genlerin ifadesini engeller. PRDM16 kahverengi adipogenezdeki diğer önemli molekül olan PPAR $\gamma$ 'ya bağlanarak aktive eder (Frühbeck vd., 2009). PPAR $\gamma$ ; mitokondriyal biyogenezin artması, *PGC-1 $\alpha/\beta$*  ve *Ucp1*'nin ifade edilmesi gibi kahverengi adipositlere özgü anahtar özellikleri uyarır. (Frühbeck vd., 2009; Rosen ve Spiegelman, 2006). PRDM16 farklılaşmanın sonraki aşamasında miyogenezin diğer genlerini [*MyoD*, *miyogenin*, *miyosit enhansır faktör 2 (MEF2)* ve *miyojenik ilişkili faktör 4 (MRF4)*] baskılar. *Ucp1*, *PGC-1*, çok uzun yağ asitlerinin uzama proteini 3 (*Elovl3*) ve hücre ölümü aktivatör-A (*Cidea*) gibi kahverengi adipositlere özgü genlerin ifade edilmesi için PPAR $\gamma$  ve PRDM16'nın aynı anda aktive edilmesi gereklidir (Şekil 1.23, Şekil 1.24a) (Frühbeck vd., 2009; Seale vd., 2008).



**Şekil 1.23.** Mezenşimal öncül hücrelerin beyaz ve kahverengi adipositlere farklılaşması. (Frühbeck vd., 2009)

Çalışmalar kemirgenler ve sıçanlarda iki tip UCP1-pozitif hücre olduğunu göstermiştir. Bunlardan biri KYD’de bulunan klasik kahverengi adipositlerdir. Diğeri ise belirli aralıklarla BYD’de yer alan bej veya brite hücrelerdir. Bu iki hücre tipi ayrı gelişimsel kökenlerden farklılaşırlar. Bej hücreler multiloküler lipid damlacıkları, fazla mitokondri ve *Ucp1* ifade etmeleriyle kahverengi adipositlere benzerler (Kajimura ve Saito, 2014).  $\beta_3$ -AR bej hücre gelişimi için çok önemlidir (Himms-Hagen vd., 2000). Fakat *Myf5*-negatif hücre soyundan köken alırlar. Bej hücrelerinin uyarıları kronik soğuk,  $\beta$ -adrenerjik uyarı, PPAR $\gamma$  veya direnç egzersizidir (Kajimura ve Saito, 2014).

PDGF $\alpha$  ifade eden adiposit öncülleri, çeşitli çevresel uyarılar sonucu, genellikle subkutan BYD’den farklılaşırlar (Lee vd., 2012). Bej hücreler bej öncüllerden (Şekil 1.24b, i), bipotent preadipositlerden (Şekil 1.24b, ii) veya olgun beyaz adipositlerden farklılaşırlar (Şekil 1.24b, iii) (Kajimura ve Saito, 2014).



**Şekil 1.24.** Kahverengi ve beyaz adipositler arasındaki gelişimsel hiyerarşi, **a)** KYD ve iskelet kası gelişimi, **b)** BYD ve bej hücre gelişimi. Mor kesik çizgiler teorik ilişkileri göstermektedir (Kajimura ve Saito, 2014)

Obeziteyle mücadelede adipogenezde yer alan moleküller ve beyaz yağ hücrelerinin kahverengi yağ hücrelerine dönüşmesini uyaran olası ajanlar büyük ilgi görmektedir. KYD'nin miktarını ve aktivitesini artırarak enerji dengesini negatif çevirmek fazla kilo ve obezitede kilo kaybını sağlayabilir.

## 1.7 Obezite

Obezite vücutta aşırı yağ birikimi olarak tanımlanır. Genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimine bağlı, kompleks, kronik, multifaktöriyel bir hastalıktır (Comuzzie vd., 2001). Önde gelen halk sağlığı problemlerinden biridir ve bazı ülkelerde yaygın bir hastalıktır (Jocken ve Blaak, 2008). Kardiyovasküler hastalık, tip 2 diyabet ve bazı kanserlerde risk oranını artırır (Wisse vd., 2007). Obezitede enerji alımı ve harcanması arasındaki denge bozulur ve fazla kalori organizmada depolanır. Dengenin bozulmasının nedeni, daha çok yüksek kalorili diyet ve hareket

azlığıdır. Obezite genetik yapı ve çevre arasındaki değişken ve karmaşık etkileşimlerin bir sonucudur (Frühbeck vd., 2009).

### 1.7.1 Adrenomedullin ve obezite

AdM birçok dokuda sentezlenen çok işlevli bir peptiddir. Adipositler (Li vd., 2003) ve adipoz dokunun da (Nambu vd., 2005) AdM ürettiği ve salgıladığı gösterilmiştir. TNF- $\alpha$  gibi inflamatör sitokinler ve lipopolisakkarit, adipoz dokuda *AdM* ifadesini uyarırlar (Allaker vd., 1999; Sugo vd., 1995). Ek olarak obezite, adipoz dokuda AdM ifadesinin artmasına neden olur. Yüksek yağ diyetiyle beslenen sıçanların yağ dokusunda *AdM* ifadesi, normal diyetle beslenenlere göre daha fazladır (Fukai vd., 2004). Obez bireylerin plazmalarında AdM konsantrasyonu artar ve bu artışın kaynağının adipoz doku olduğu ileri sürülmektedir (Kato vd., 2002). Vücut ağırlığı artıkça AdM ifadesi de artış gösterir (Nambu vd., 2005). Obezitede *AdM* ifadesinin artışı, AdM'in obezite ve obeziteyle ilişkili hastalıkların patojenezine dahil olduğunu göstermektedir.

Metabolik sendrom; aterosjenik dislipidemi, kan basıncında artış, insülin direnciyle beraber glikoz seviyesinde artış, protrombolik ve proinflamator durumlar obeziteyle birlikte. Omental yağ dokusu obeziteyle ilişkili hastalıklarda ve metabolik sendromda önemli bir rol oynar. Omental dokuda ifade edilen AdM, metabolik sendromla yakından ilişkilidir (Paulmyer-Lacroix vd., 2006). Omental dokudan salgılanan AdM'in metabolik sendroma karşı bir görev yaptığı ileri sürülmektedir. Ayrıca AdM'in adipoz dokuda ifade edildiğini kanıtlayan çalışmalar, AdM'in adipokin ailesini bir üyesi olduğunu göstermektedir (Li vd., 2007).

### 1.7.2 SIRT1 ve obezite

SIRT1 insan adipoz dokusunda metabolik olarak düzenlenir (Pedersen vd., 2008) ve SIRT1 aktivitesi yağ dokusunu harekete geçirir. SIRT1 aktivatörleri yüksek yağ diyetiyle beslenen farede obezite ve insulin direncine karşı koruyucudur (Clark vd., 2012). *SIRT1* geninde bulunan tek nükleotit polimorfizm (SNP)'leriyle obezite arasında bir ilişki bulunur (Peeters vd., 2008). Obez ve zayıf insanların subkutan yağ dokularındaki *SIRT1* mRNA ifadeleri karşılaştırıldığında, zayıf insanlarda *SIRT1* ifadesinin iki kat daha fazla olduğu görülür (Pedersen vd., 2008).

Kalori kısıtlamasından en çok etkilenen genler sirtuinlerdir. Farelerde kalori kısıtlaması ile yüksek kalorili diyetin meydana getirdiği gen ifadesindeki

değişiklikler karşılaştırıldığında, aralarında sirtuinlerin de bulunduğu 3,000'den fazla genin ifadesinin 10 ve 50 kat arasında değiştiği bulunmuştur (Estep vd., 2009). İnsanlarda *SIRT1* gen ifadesi kalori alımına duyarlıdır. Kalori kısıtlaması *SIRT1* gen ifadesini artırır (Allard vd., 2008). Obez farelerin adipoz dokularında *SIRT1* ifadesi azalır (Qiao ve Shao, 2006). *SIRT1*'in adipoz dokuda fazla ifade edilmesi ise adipogenezin gecikmesi ve lipolizin artmasına neden olur (Picard vd., 2004). Obez bireylerde sekiz haftalık düşük kalorili diyet, *SIRT1* ve *SIRT2* ifadelerini artırır (Crujeiras vd., 2008). Sirtuindeki değişiklikler BYD'de lipolizin ve yağ asit mobilizasyonunun artmasıyla ilişkilidir (Picard vd., 2004).

### 1.7.3 Anjiogenez ve obezite

Anjiogenez bütün dokuların büyümesi, gelişmesi ve tamirinde çok önemlidir (Folkman, 1995). Adipoz doku ve özellikle KYD, her yağ hücresi kapillerlerle kuşatıldığından dolayı, olasılıkla vücutta en çok damarlanan dokudur. Aslında anjiogenezin adipogenez ve obezitenin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Diyabetik komplikasyonlar, kardiyovasküler bozukluklar ve malignanslar gibi obezite bağımlı bozukluklar patolojik anjiogenez ile birlikte (Cao, 2007).

Büyüyen adipoz dokuda anjiogenik damarlar, sayısız mekanizmalarla adipogenezde katkıda bulunurlar. Vücudun diğer dokularında olduğu gibi, kan damarları adipositlerin büyümesi ve sürekliliği için gerekli olan besin ve oksijeni sağlarlar. Özellikle KYD'deki vasküler perfüzyonun artırılması, yakıtları yakmak için gereken oksijen moleküllerini sağlayarak metabolik hızı daha da artırabilir (Cao, 2007).

Yetişkin adipoz doku olasılıkla vücuttaki en plastik dokudur ve yetişkin hayatı boyunca genişler ve küçülür (Cao, 2007). Damarlanma; mikrodamar sayısının kontrol edilmesi ve varolan damarların yeniden şekillendirilmesi aracılığıyla adiposit büyümesi, gerilemesi ve fizyolojik fonksiyonlarının saptanmasında rastgele bir göreve sahip olabilir. Örneğin damarların yeniden şekillenmesi, adipoz dokuların genişlemesi ve küçülmesini sağlayan adipositlerin sayısını ve şeklini kontrol eden kan perfüzyonunu değiştirebilir (Cao, 2010).

Endotel hücreler ve adipositler arasındaki karşılıklı etkileşim, bu hücrelerin herhangi bir bölümündeki fonksiyon bozukluğunun diğer bir sistem üzerinde önemli etkilere sahip olacağını akla getirir. Örneğin obez bireylerdeki endotelial bozukluk,

tip 2 diyabetin gelişimi ve ilerlemesinde önemli bir katkıda bulunur. Adipoz dokulardaki bozulmuş vasküler fonksiyonlar, lipid metabolizmasında değişikliklere ve insülin direncinin gelişmesine yol açabilir (Jansson, 2007). Böylece obez bireylerdeki endotelial işlevin normalleştirilmesi birçok hastalığın tedavisi ve hastalıktan korunmada önemli bir yaklaşımdır (Cao, 2010).

Anjiogenezin obezite tedavisi için hedef olabileceğini ileri süren ilk hipotez, BYD büyümesi ve genişlemesinin anjiogeneze bağlı olabildiği bilgisine dayanır (Brakenhielm vd., 2004; Rupnick vd., 2002). Tümör büyümesinde denendiği gibi, adipoz dokuda anjiogenezin engellenmesi, BYD büyümesi ve obezite gelişimini engelleyebilir. Anjiostatin (O'Reilly vd., 1994) ve endostatin (O'Reilly vd., 1997) gibi endojen anjiogenez inhibitörlerinin obez farelerin vücut ağırlığını azalttığı gösterilmiştir (Rupnick vd., 2002).

Obezite için ilk tedavi yolu olarak adipoz doku anjiogenezinin engellenmesi önerilmesine rağmen, bu kavram son zamanlarda enerji tüketiminin de anjiogenezi gerektirebildiği paradoksuyla çelişmektedir (Cao, 2007; Xue vd., 2009). Obeziteden korunmada KYD'nin geliştirilmesi son derece doğrudur. Bu nedenle obezite tedavisinde negatif veya pozitif anjiogenez düzenleyicilerden hangisinin kullanılabileceği belirsizdir. Bu durum anjiogenez düzenleyici uygulanan kişinin adipoz dokusunun metabolik durumuna bağlı olmalıdır. Metabolik olarak aktif olan adipoz dokusunun (KYD) anjiogenik damarları arttırılırsa daha fazla enerji tüketecektir. Fakat tersine metabolik olarak pasif olan büyük miktardaki BYD dokusuna sahip olan obez bireylerde anjiogenezin engellenmesi daha yararlı olabilir (Cao, 2007).

#### **1.7.4 Resveratrol ve obezite**

Diyetleri resveratrol ile desteklenen obez fareler uzun yaşar, daha aktif olur ve yüksek kalori diyetinin neden olduğu negatif etkiler daha az görülür (Baur vd., 2006). Resveratrol vücut depo dokularındaki adipositler ve kemik iliği üzerinde obezite karşıtı etkilere sahiptir. Resveratrol adipogenezi ve olgunlaşan preadipositlerin yaşayabilirliğini azaltır. Ayrıca olgun adipositlerde lipolizi artırır, lipogenezi azaltır. Bu işlevi adipositlere özgü transkripsiyon faktörlerini, enzimlerini azaltarak ve mitokondriyal işlevi düzenleyen genler aracılığıyla sağlar (Rayalam vd., 2008). Resveratrolün diyetle alınmasının yüksek yağ diyetiyle beslenen farelerde obeziteye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Bu farelerde insülin direnci

gelişmemiştir ve KYD’de UCP1 seviyesinin artması sonucu soğuğa karşı daha dirençlidirler. Sonuç olarak enerji tüketimi besin alımı artmadan azalır (Lagouge vd., 2006). Resveratrol insan preadipositlerinde SIRT1 bağımlı bir yolla çoğalma ve adipojenik farklılaşmayı engeller (Fischer-Posovszky vd., 2010). Resveratrol kalori tüketiminin anahtar enzimleri olan sirtuinlerin aktivitesini artırır (Zhang, 2006).

### 1.7.5 Adipoz doku ve obezite

Canlılarda enerji dengesi Termodinamiğin İlk Kanunu’na uyar: alınan enerji = harcanan enerji + depolanan enerji. Alınan kalori ölçülebilir fakat zor olan vücudun alınan veya harcanan enerjideki değişikliklere karşı cevabının ölçülmesidir (Rosen ve Spiegelman, 2006). Enerji homeostazı genellikle kilo almaktan korunmak üzere düzenlenir (Schwartz vd., 2003). Bu nedenle aşırı alınan enerji termogenezi aktive eder. Fakat alınan enerjideki istemli kısıtlamalar, vücutta kilo vermeyi zorlaştıran istemsiz az enerji harcanmasına neden olur. Enerji dengesi hormonlar, nöral girdiler, fizyolojik ve kültürel faktörler gibi birçok faktörden etkilenir (Abizaid vd., 2006). Bu nedenle antiobezik stratejiler geliştirmek oldukça zordur.

Obeziteyle savaşta KYD ile ilgili iki kavram üzerinden strateji geliştirilebilir:

1. Mevcut olan KYD’nin aktive edilmesi;
2. Kahverengi adipositlere özgü genleri aktive ederek KYD’yi oluşturmak (Frühbeck vd., 2009).

Tamamen uyarıldığında 50 g KYD günlük enerji tüketiminin %20’sini karşılar (Gesta vd., 2007). KYD dokusunu aktive etmek günlük enerji tüketimini artırır ve obezitenin geriletilmesinde kullanılabilir bir yoldur. KYD sempatik sinir sisteminin kontrolü altında olduğundan, ilk akla gelen sempatomimetik ilaçlardır. Fakat bu ajanlar uzun süreli tedavi için uygun değildir (Carey ve Kingwell, 2013). Obez bireylerde *Ucp1* mRNA seviyelerinin zayıf insanlara göre daha düşük olduğu bulundu (Oberkofler vd., 1997). Bu nedenle *Ucp1* ifadesini artırmaya yönelik pek çok çalışma yapıldı. Fakat aşırı UCP1 adipositler için sitotoksik olabilir ve KYD’de atrofiye neden olabilir (Stefl vd., 1998). Ek olarak 2,4-dinitrofenol gibi kimyasal proton gradienti bozucular obezitenin geriletilmesinde başarılı olamamıştır (Grundlingh vd., 2011).

UCP1 üzerine yapılan çalışmalardan önemli bilgiler elde edilmiştir. Ancak UCP1 tek başına KYD’nin termogenik aktivitesi hakkında bilgi vermez. Ek olarak UCP1 oksidatif fosforolasyon, yağ asiti alımı ve metabolizması gibi birçok faktörden

etkilenir (Kajimura ve Saito, 2014). Termogenez ve UCP1 yollarında birçok molekül bulunur. Bu moleküllerle ilgili birçok çalışma yapılmıştır.

PGC1 $\alpha$  mitokondriyal biyogenez, adaptif termogenez ve *Ucp1* ifadesini uyarır (Rosen ve MacDougald, 2006). Beyaz adipositlerin *in vitro* PGC1 $\alpha$  ifade etmesi sağlandığında kahverengi adiposit özelliği gösterirler (Tiraby vd., 2003).

Transgenik farelerin adipositlerinde bazı dokuların erken gelişimi ve farklılaşmasında işlev yapan forkhead box protein C2 (FOXC2)'nin fazla ifade edilmesi ile *Ucp1* ifadesi artar ve BYD'nin KYD'ye dönüşümüne neden olur (Cederberg vd., 2001).

Reseptör etkileşim proteini 140 (RIP140), *Ucp1*'in kopyalanmasını engelleyen nükleer bir reseptör korepresördür. Bu protein uzaklaştırıldığında yağ asidi oksidasyonu, glikoz toleransı ve insülin duyarlılığı artar, fareler zayıf fenotip gösterirler. Ayrıca, *Ucp1* gibi birçok metabolik genin ifadesi artar (Parker vd., 2006) *RIP140*-null kahverengi veya beyaz adipositlerde *Ucp1* mRNA artar (Costford vd., 2007).

KYD'de yüksek miktarda *Cidea* ifade edilir. *Cidea*'nın UCP1 proteiniyle etkileşime girerek onu inhibe ettiği ileri sürülmektedir. *Cidea*-null farelerin metabolik hızları daha yüksektir ve KYD'de lipoliz mevcuttur. Soğuğa maruz kaldıklarında ise vücut ısıları daha fazla yükselir. Bu hayvanlar zayıftır ve diyetin oluşturduğu obezite ve diyabete karşı daha dayanıklıdır (Zhou vd., 2003).

Retinoik asit adipositlerde *Ucp1* ifadesini artırır (Costford vd., 2007). Fakat retinoidlerin birçok etkiye sahip olmalarından dolayı obezite tedavisinde kullanılmaları pek olası değildir (Frühbeck vd., 2009).

Bir adipokin olan apelin fareye uygulandığında vücut ısısı, oksijen tüketimi ve KYD'de *Ucp1* ifadesi artar (Higuchi vd., 2007).

Daha sonraları KYD üzerine yapılan çalışmalar genellikle *Ucp1*'in ifadesini artıran doğal moleküller üzerine olmuştur. Ek olarak obeziteyle savaşta BYD ile ilgili stratejiler de geliştirilmiştir. Bu stratejilerin çoğu BYD'nin KYD özellikleri kazanmasıyla, yani BYD'nin kahverengileştirilmesiyle ilgilidir. Transdiferansiyon farklılaşmış somatik hücrelerin, bir öncül hücre basamağı veya ara pluripotent aşama geçirmeden başka bir hücre tipine dönüşmesidir (Kajimura ve Saito, 2014). Kronik olarak soğuğa maruz kalmak ve uzun  $\beta$ -adrenerjik uyarı sonucunda BYD, kahverengi adipositlere benzer hücrelere dönüşebilir (Granneman vd., 2005; Watanabe vd., 2008). PGC1 $\alpha$  beyaz adipositlere uygulandığında KYD'deki mitokondriyal



biyogenez ve UCP1 aktivitesi gibi birçok özelliğin ortaya çıkmasına neden olur (Puigserver vd., 1998).

Çalışmalar bej hücrelerin vücudun ihtiyacına göre hem kahverengi hem de beyaz adipositlere dönüşme kapasitesinde olduğunu ve obeziteyle mücadelede hedef hücreler olabileceklerini göstermektedir. Subkutan BYD'deki bej hücreler adrenerjik uyarı sonucu, öncül mitotik proliferasyona gerek duymadan kahverengileşirler (Lee vd., 2012). BYD'de bej hücrelerin sayısı artırıldığında farelerin diyetle oluşturulan obeziteye karşı dirençli oldukları görülür (Cederberg vd., 2001). Aynı şekilde soğuk uygulanmış bej hücreler, sıcak adaptasyonundan 5 hafta sonra tekrar beyaz adipositlere dönüşürler (Rosenwald vd., 2013).

*Ucp1* kopyalama seviyeleriyle ilgili pek çok gen lokusu BYD'de bulunur fakat KYD'de bulunmaz. Bu BYD ile KYD arasında *Ucp1* gen kontrolünü sağlayan mekanizmalar olduğunu gösterir (Xue vd., 2005). PRDM16 protein stabilitesi, PPAR $\gamma$  agonistleri tarafından kontrol edilir (Kajimura ve Saito, 2014). Antidiyabetik ilaçlar olan sentetik PPAR $\gamma$  agonist thiazolidinedion (TZD)'ların BYD'ye uygulanması sonucu, dokuda *Ucp1* mRNA'ları ve bej hücre farklılaşması gözlenmiştir (Digby vd., 1998). Fakat TDZ kullanımı kardiyak ve kemik dokularında hasara, ayrıca BYD'nin hacminin artmasına neden olmaktadır (Frühbeck vd., 2009). PPAR $\gamma$  agonisti rosiglitazone PRDM16'nın yarı ömrünü uzatarak BYD'nin KYD'ye farklılaşmasını sağlar (Kajimura ve Saito, 2014).

Obezite önemli bir sağlık sorunudur. Pek çok araştırmacı bu sorunla ilgili çalışmalar yapmaktadır. Bu çalışmanın amacı, obez organizmanın obeziteye nasıl reaksiyon verdiğini ve bu reaksiyonda AdM, resveratrol ve SIRT1'in etkisini ortaya koymaktır. Bunlardan yola çıkarak obeziteyi ve neden olduğu hastalıkların verdiği hasarları engellemek ve işe karışan mekanizmaları açıklamaya çalışmaktır. Birçok hastalıkta olduğu gibi, obezite durumunda organizmanın doğal koruma mekanizmasında AdM'in rolü araştırılmıştır.

BYD'de vücuttaki kahverengi yağ dokularından ayrı ve farklı embriyonik kökene sahip kahverengi benzeri hücreler bulunur. Bu hücrelere "akıllı" veya "bej" hücreler adı verilir ve kahverengi adipositlere dönüşme potansiyelleri vardır (Barbatelli vd., 2010). Bu kanıtlardan yola çıkarak kahverengi adipositlerin farklılaşmasını ve sayısını artırarak obeziteyle mücadele etme yöntemi, son derece etkili olacaktır. Bu farklılaşma resveratrolün aktive ettiği *SIRT* geni ifadesiyle sağlanmak amaçlar arasındadır.

## 2 KAYNAK ÖZETLERİ

Asano vd. sıçanlarda soğuk etkisinin kahverengi yağ dokusundaki iki anjiyogenik faktör üzerine etkisini incelemişlerdir. Sıçanları 4 °C soğuğa maruz bıraktıklarında *VEGF* mRNA seviyelerinin 1-4 saatte 2.7 katına çıktığını ve 24 saat içinde bazal seviyesine indiğini görmüşlerdir. Fakat soğuğa maruz kalma esnasında *VEGF-B* mRNA seviyelerinde bir değişme görmemişlerdir. Bazal fibroblast büyüme faktörü (*bFGF*) mRNA seviyelerinde ise mRNA ifadesinin 4 saatte 2.3 kat arttığı ve 24 saatte bazal seviyesine geldiği bulunmuştur. Sonuç olarak KYD'nin aktive edilmesinde anjiyenez etkilidir (Asano vd., 1999).

Minami ve ark. esansiyel hipertansiyonlu 12 obez hastada [48-81 yaşlarında, vücut kitle indeksi (VKİ) 26-34 kg/m<sup>2</sup>] AdM, atriyal natriüretik peptid (ANP) ve beyin natriüretik peptid (BNP) üzerine düşük kalorili diyetin etkisini incelemişlerdir. Hastalara ilk hafta 2000 kcal/gün standart diyet, sonraki üç hafta sabit sodyum alımıyla birlikte 850 kcal/gün düşük kalorili diyet uygulanmıştır. Düşük kalorili diyet süreci esnasında hastaların 3.7 +/- 0.2 kg zayıfladıkları görülmüştür. Plazma AdM, ANP ve BNP konsantrasyonları düşük kalorili diyetle önemli derecede azalmıştır. Sonuçlar bu vazodilatör peptidlerin esansiyel hipertansiyonlu obez hastalarda kan basıncının daha fazla yükselmesine karşı etki yapabildiğini göstermiştir (Minami vd., 2000).

PAMP, AdM prekürsöründen elde edilen hipotensif bir peptiddir. Ohinata ve ark. ekzojen uygulamadan sonra PAMP'nin kan glikoz, besin alımı ve gastrik boşalma üzerine etkisini araştırmışlardır. PAMP merkezi enjeksiyondan sonra kan glikoz seviyelerini artırmış ve aç farede besin alımı ve gastrik boşalmayı engellemiştir. Çalışmalar beslenme ve gastrik boşalmanın PAMP'ye özgül reseptör aracılığıyla düzenlendiğini göstermiştir (Ohinata vd., 2001).

Shinomiya ve ark. kronik iskemik felçli hastalarda plazma AdM seviyeleri ile ateroskleroza araştırmışlardır. Yüksek sistolik kan basıncı olan hastalarda ağır karotid arter aterosklerozda değişen değerlerle artan AdM seviyelerinin birlikte olduğu bulunmuştur (Shinomiya vd., 2001).

PGC1 $\alpha$  KYD'de soğuk etkisiyle indüklenebilir. PGC1 $\alpha$  ile transfekte edilen insan beyaz adipositleri, UCP1 ifade ederek kahverengi yağ hücresi fenotipi göstermişlerdir (Tiraby vd., 2003).

Fukai ve ark. AdM ve reseptörünün adipoz dokudaki gen ifadesini, obezite gelişimindeki değişimlerini ve preadiposit farklılaşma sürecini incelemişlerdir. Adipoz dokuyu oluşturan olgun adipositler ve stromal vasküler hücreler AdM ifade ederler. AdM ve reseptör bileşenleri (CRLR/RAMP2) mRNA'larının epididimal, mezenterik, retroperitoneal ve subkutan adipoz dokular gibi çeşitli sıçan adipoz dokularında ifade edildiği bulunmuştur. Fare preadiposit hücre dizisinde (3T3-L1) ifade edilen *AdM* mRNA'sı üçüncü günde geçici olarak azalmış, altıncı günde bazal seviyesine geri dönmüştür ve sonra hücrelerden salgılanan AdM'e paralel olan preadiposit farklılaşması sırasında dokuzuncu günde artış göstermiştir. Ancak endojen AdM'i bloke etmek için eklenen ekzojen AdM veya AdM reseptör antagonisti CGRP-(8-37) preadiposit farklılaşması sırasında lipid damlacığı birikimini etkilememiştir. Bu bilgiler AdM'in adipokinlerin yeni bir üyesi olabildiğini ortaya koymaktadır (Fukai vd., 2004).

Nambu ve ark., adipoz dokuda AdM'in ekspresyonunu ve sekresyonunu incelemişlerdir. Northern blot analizleri sonucu fare adipoz dokusunda belirgin bir AdM mRNA ifadesi olduğunu göstermişlerdir. Adipoz dokusunda ifade seviyelerini böbrekten 2.5-3.2 kat, olgun adipositlerde AdM mRNA seviyelerini ise stroma-vasküler adipoz dokusundan 7.3 kat fazla bulmuşlardır. Sonuç olarak adipoz dokunun vücuttaki ana AdM kaynağı olduğu ve adiposit kaynaklı AdM'in obezitede patolojik bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Nambu vd., 2005).

Harmancey ve ark. çalışmalarında insan beyaz adipositleri ve 3T3-F442A kökenli adipositlerin AdM ürettiğini ve bu AdM'in lipid metabolizması üzerine otokrin/parakrin bir rol oynadığını göstermişlerdir. AdM, NO bağımlı mekanizma ile  $\beta$ -adrenerjik olarak uyarılan lipolizi engellemiştir. İlk kez AdM'in adipositlerdeki lipolizi azalttığı gösterilmiştir (Harmancey vd., 2005).

Adipokinler merkezi sinir sistemine veya doğrudan vasküler damarlar üzerine etki ederek hipertansiyona neden olabilirler. Takahashi ve ark. vasküler endotel hücrelerde üç adipokin; leptin, resistin ve TNF- $\alpha$ 'nın AdM ve endotelin-1 ifadesini etkileyip etkilemediğini araştırmışlardır. İnsan umbilikal veni endotel hücrelerini leptin, AdM ve TNF- $\alpha$  ile 24 saat kültüre etmişlerdir. Çalışma sonunda obez deneklerde TNF- $\alpha$ 'nın AdM ifadesini azalttığı, bunun hipertansiyon riskini artırdığı ve kardiyovasküler hastalıklarla bağlantılı olabildiği bulunmuştur (Takahashi vd., 2005).

Knerr ve ark. çocuk ve yetişkin adipoz dokularında vazoaktif sistemlerin AdM ve endotelin-1'in sentezlenip sentezlenmediğini araştırmışlar ve NOS'nin dağılım modelini saptamışlardır. 15 çocuk (0.5-16 yaş, ortalama 6 yaş) ve 13 yetişkinden (43-79 yaş, ortalama 60 yaş) subkutan, mezenteryal ve omental adipoz doku örnekleri toplamışlardır. Bu deneklerde VKİ normal sınırlardadır. Tansiyonları normaldir ve infeksiyon hastalıkları, metabolik veya endokrin hastalıkları bulunmamaktadır. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (rtPZR) ile AdM, endotelin-1, endotelyal nitrik oksit sentetaz (*eNOS*), indüklenebilir NOS (*iNOS*) mRNA seviyelerini araştırmışlardır. Bütün dokularda AdM gen ifadesi bulunmuştur ve yetişkinlerde çocuklara göre önemli derecede yüksektir. Endotelin-1 mRNA'sı da benzer dağılım göstermiş ve yetişkin subkutan ve mezenteryal adipoz dokusunda çocuklara göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. *eNOS* de yetişkin subkutan ve mezenteryal adipoz dokusunda çocuklara göre daha yüksek bulunmuştur. *iNOS* mRNA'sı subkutan, mezenteryal ve omental adipoz dokusunda yetişkin grubunda çocuklara göre daha fazla bulunmuştur. İnsan adipoz dokusunun bu vazoaktif maddeleri, *eNOS* ve *iNOS* mRNA'larını ifade ettiğini ve bunların yaşla beraber arttığı bulunmuştur (Knerr vd., 2005).

Li ve ark. *AdM* geninin 36-bp bölgesini baskılayarak adiposit farklılaşmasında bu elementin işlevini araştırmışlardır. 3T3-L1 hücrelerinin insülin, deksametazon ve 3-izobütil-1-metilksantin kullanılarak adipositlere farklılaşmalarını sağlamışlardır. Farklılaşmanın üçüncü gününde *AdM* geninin promotor analizleri sonucu, adipositlerdeki promotor aktivitenin %20 azaldığı görülmüştür. Çalışma sonucunda preadipositlerde *AdM* gen ifadesinin önemli olabileceği ve adipositlerde baskılanabileceği sonucuna varılmıştır (Li vd., 2006).

Paulmyer-Lacroix ve ark. insan adipoz dokusunda AdM'in kesin yerini araştırmak ve obezitede AdM regülasyonunu incelemek üzere bir çalışma yapmışlardır. *AdM* ifade değişiklikleri için 9 zayıf ve 13 obez kadının subkutan ve omental adipoz dokularının profili araştırılmıştır. İnsan adipoz dokusundan preadipositler izole edilmiş ve adipogenik koşullar altında farklılaştırılmıştır. Analizler sonucunda damar duvarlarında, stromal hücre kümelerinde ve izole stromal hücrelerde güçlü bir *AdM* ifadesi gözlenmiştir. Erken farklılaşma aşamasındaki preadipositler kendiliğinden AdM salgılamışlardır. Subkutan ve omental adipoz dokuları arasında AdM yerleşiminde hiçbir fark görülmemiştir. Zayıf ve obez denekler arasında subkutan dokudaki AdM seviyelerinde de bir farklılık

görülmemiştir. Fakat zayıflarla karşılaştırıldığında, obezlerde omental doku AdM seviyeleri önemli derecede yüksek bulunmuştur. Ek olarak omental AdM ile *TNF- $\alpha$*  mRNA seviyeleri arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. AdM'in sentezinin omental bölgede obezite esnasında arttığı ve metabolik sendrom özellikleriyle paralel olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle AdM adipokin ailesinin yeni bir üyesi olarak değerlendirilmelidir (Paulmyer-Lacroix vd., 2006).

Go ve ark. erkek Sprague-Dawley sıçan gruplarına subkutan 2.5 mg/kg fenilefrin, 2.5 mg/kg izoproterenol ve her iki ilaçtan 2.5 mg/kg olmak üzere günde iki kere dört gün süreyle enjekte etmişlerdir. Skapular KYD ve epididimal BYD örnekleri toplanarak AdM seviyeleri, *preproAdM* ifadesi, CRLR ve RAMP'ler radyoimmünoassay ve rtPZR ile ölçülmüştür. KYD'de AdM ve AdM reseptör bileşenleri gen ifadesi epididimal BYD'den daha az bulunmuştur. KYD'ye  $\alpha_1$  ve  $\beta$  adrenoreseptör agonistlerinin beraber uygulamasından sonra AdM peptid seviyelerinde ve  $\alpha_1$  ve  $\beta$  adrenoreseptör agonistlerinin tek başına veya beraber uygulamalarından sonra *preproAdM* mRNA seviyelerinde artış görülmüştür.  $\alpha\beta$  grubunun hem CRLR hem de RAMP mRNA seviyeleri önemli derecede artmıştır. BYD'de AdM peptid seviyesi, *RAMP1* ve *RAMP2* mRNA ifade seviyeleri  $\alpha$  grubunda; CRLR mRNA seviyesi ise  $\beta$  grubunda artmıştır. AdM seviyeleri, reseptörü ve RAMP'ler KYD'de BYD'dekinden daha azdır. Fakat adrenerjik stimülasyonun AdM üzerine büyük etkileri bulunmaktadır. AdM lipolizi uyarır ve KYD'de UCP1 seviyesini artırır. Bu yüzden serbest yağ asiti substratlarının mevcudiyetini ve mitokondriyal membranda UCP1 seviyesini artırarak termogenezi artırabildiği ileri sürülmüştür (Go vd., 2007).

Harmancey ve ark. AdM üretimi bozulan hücre dizileri üretmişlerdir. AdM sentezinin azalması yoğun bir şekilde adipoz farklılaşmasını hızlandırmıştır. Bu nedenle AdM'in bir antiadipogenik faktör olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bunun üzerine bir proadipogenik faktör olan insülinin AdM ifadesini kontrol edip etmediğini araştırmışlardır. Analizler sonucunda izole edilmiş insan adiposit hücrelerinde insülinin AdM ifadesi üzerine inhibitör etkisi olduğunu gözlemlenmiştir. Sağlıklı obez hastalarda dolaşımdaki AdM'in zayıf hastalarinkinin üç katı olduğunu bulmuşlardır. Bu obez hastalarda AdM plazma seviyelerinin negatif olarak insülin seviyelerine bağlı olduğu görülmüştür (Harmancey vd., 2007).

Guidolin ve ark. vena saphena'dan izole edilen normal yetişkin vasküler endotel hücrelerini kullanarak AdM'in *in vitro* erken (artmış hücre proliferasyonu)

ve geç (farklılaşma ve kapiller benzeri yapılara kendini örgütlenme) anjionik olaylardaki rolünü ve VEGF sinyal basamağı ile ilişkisini araştırmışlardır. Sonuçlar vasküler endotel hücrelerde AdM'in AdM<sub>1</sub> reseptörüne bağlanmasının hücrelerde anjiogenez gibi sinyal basamaklarına yol açan VEGFR-2 reseptörünün transaktivasyonunu tetikleyebildiğini göstermiştir (Guidolin vd., 2008).

Nomura ve ark. obez ve obez olmayan deneklerde biyolojik olarak aktif AdM-NH<sub>2</sub> ve AdM-glisinin ara formunu ölçmüşlerdir. Obez deneklerde hem AdM-NH<sub>2</sub> hem de AdM-glisin seviyelerini obez olmayanlardan daha yüksek bulmuşlardır. AdM'in bu iki molekül formu plazma seviyeleri ve VKİ ile arasında önemli bir ilişki görülmüştür. Sonuçlar metabolik hastalıklarda bu iki molekülün aktif görevlerinin belli kardiyovasküler hastalığı olmayan deneklerde obeziteyle ilgili olduğunu göstermiştir (Nomura vd., 2009).

Martinez-Álvarez ve ark. CGRP, AdM ve AdM-2'nin akvaryum balığında (*Carassius auratus*) besin alımının düzenlenmesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla bu hormonları intraserebroventriküler olarak uygulamışlardır. 10 ng/g CGRP, 10 ve 50 ng/g AdM-2 uygulamasının, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında besin alımını önemli derecede azalttığı görülmüştür. Fakat AdM uygulaması sonrasında herhangi önemli bir farklılık gözlenmemiştir (Martínez-Álvarez vd., 2009).

C/EBP $\beta$  ve PRDM16 güçlü kahverengi yağ hücresi fenotipi indükleyicileridir. Multipotent öncüllerin kahverengi yağ hücresine farklılaşmasında önemli bir moleküler kompleksi oluştururlar. Bu kompleksler deri fibroblastlarında ifade ettirilerek hücrenin tam fonksiyonel kahverengi adiposit gibi davranması sağlanmıştır (Kajimura vd., 2009).

PPAR $\gamma$ , adipositlerin gelişiminde ve gen ifadelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan transkripsiyon faktörüdür. Tiazolidinedionlar glisemiye kontrol etmek için kullanılan sentetik ligantlardır ve PPAR $\gamma$  agonistidir. Fareler, sıçanlar ve köpeklerde BYD'nin KYD benzeri dokulara dönüştürme yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir (Koh vd., 2009; Toseland vd., 2001; Wilson-Fritch vd., 2004) .

Shibasaki ve ark., koroner arter hastalığı olan ve olmayan hastaların epikardiyal adipoz dokularında ifade edilen adipokinler, adipositokinler ve vazoaktif peptidler arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Hastalardan kan örnekleri, epikardiyal ve subkutan adipoz dokular toplayarak serum sitokin seviyelerini ve rtPZR ile epikardiyal ve subkutan adipoz dokudaki çeşitli moleküllerin mRNA seviyelerini

ölçmüşlerdir. Epikardiyal adipoz dokusunda *IL-6*, *IL-1 β*, monosit kemoatraktan protein 1 (*MCP-1*) ve *TNF-α* mRNA seviyelerinin subkutan adipoz dokudan önemli derecede yüksek olduğu bulunmuştur. İlginç olarak *IL-6*, *IL-1 β*, *MCP-1*, natriüretik peptid reseptör-C (*NPR-C*), *AdM* ve leptin mRNA seviyeleri koroner arter hastalığı olan hastalarda, hasta olmayanlardan daha yüksek seviyede bulunmuştur (Shibasaki vd., 2010).

Kahverengi yağ hücresi oluşumunu veya beyaz yağ hücresinin kahverengi yağ hücresine dönüşümünü uyaran veya baskılayan genler bilinmemektedir. Fakat *PPARγ*, koaktivatörü *PGC1α*, *C/EBPβ* ve *PRDM16* bu düzenlemede anahtar rolü oynadığı ileri sürülmüştür (Kajimura vd., 2010).

Adipoz dokusu genel olarak *BYD* ve *KYD* olarak sınıflandırılır. *BYD* ve *KYD* farklı embriyonik kökenlere sahiptir. Fakat *BYD*'de üçüncü bir adipoz hücresinin daha bulunabileceği ileri sürülmüştür. Çalışmada soğuk etkisi sonucu kahverengi adipositlerin sayısındaki artışın beyaz adiposit sayısındaki azalmadan çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu veriye göre daha önceden var olan preadipositlerin çoğaldığı ileri sürülmüştür (Barbatelli vd., 2010; Cousin vd., 1996).

Evans ve ark. endometriyal kanseri olan ve olmayan kadınlardan endometriyum örnekleri toplayarak *AdM* mRNA regülasyonu, peptid ekspresyonu, *AdM* sekresyonu ve *AdM*'in *VEGF* sekresyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Sağlıklı post menopozal endometriyumla karşılaştırıldığında *AdM* mRNA ifadesi endometriyal kanserde artış göstermiştir. *AdM* ve *VEGF* arasındaki sinerjizmin *in vivo* tümör büyümesinde önemli bir etkiyle sonuçlanabildiği gösterilmiştir (Evans vd., 2012).

*KYD*'yi artırmak üzere çeşitli ajanlar denenmiştir. Gebe olmayan memelilerde arjininin diyetle alımı sıçanlar, insanlar ve domuzları içeren birkaç türde *BYD*'nin azalmasına ve *KYD*'nin artmasına yol açmıştır. İnsanlarda ve koyunlarda fetal *KYD* gebeliğin ortasından sonra görülmeye başlar. Satterfield vd. obez koyun modeli oluşturarak maternal obezite ve arjinin desteğinin maternal, plasental ve fetal büyüme, gelişme ve sağlık parametreleri üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yumurtaları çoğaltılan normal vücut ağırlığına sahip koyunların embriyolarını obez koyunlara transfer etmişlerdir. Bu koyunlara gebeliğin 100. gününden 125. gününe kadar L-arjinin-HCl uygulamışlardır. L-arjinin uygulaması, obez koyunlarda fetal *KYD*'de %60 artışa, maternal lipit hacmi ve dolaşımdaki lipit seviyelerinde düşüğe neden olmuştur. Bu uygulama sonucunda annede gebelik süresince daha az kilo artışı

görülmüştür. KYD'leri artan bebekleri ise yaşamları boyunca obeziteye karşı daha dirençli hale gelmişlerdir (Satterfield vd., 2012).

Clark vd. *SIRT1* SNP'leri, *SIRT1* gen ifadesi ve obezite arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. VKİ 40 kg/m<sup>2</sup>'den yüksek olan yetişkin ve VKİ %97'den yüksek olan obez Kafkas Fransız çocuklarda iki SNP'yi incelemişlerdir. Rs33957861 ve rs11599176 SNP'lerin yetişkin obezitesiyle önemli bir ilişkisi olduğu bulunmuştur. İsveçli kardeşlerde ise *SIRT* mRNA ifadesini araştırmışlar ve düşük *SIRT1* ifadesinin obeziteyle beraber olduğunu bulmuşlardır (Clark vd., 2012).

Sempatomimetik ilaçların kullanım sınırlarından ötürü başka ajanların obezitenin geriletilmesinde kullanımı denenmiştir. Çalışmada obez farelerde 21 °C'de BMP7 KYD farklılaşması sağlanmıştır. Ayrıca BMP7'nin KYD aktivitesini artırırken BYD kütlesini azalttığı gösterilmiştir. Fakat 28 °C'de bu etkiler görülmemiştir. Çalışma genç farelerde yapılmıştır. BMP7 uygulaması yiyecek alımını önemli derecede artırmıştır. BMP7 kemiğin mineral içeriğini artırdığından kiloda artış, fakat yağ dokusunda azalma görülmüştür (Boon vd., 2013).



### 3 MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 DeneYlerde Kullanılan Sıçanlar

DeneYlerde İnönü Üniversitesi DeneY Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi tarafından üretilen 2 aylık 16 adet Sprague dawley (*Rattus norvegicus*) ırkı dişi sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar deneY gününe kadar 12 saat aydınlık/karanlık, havalandırılmalı, 24 °C'de, özel kafeslerde barınmışlardır. DeneYde ağırlıkları 130-170 g arasında değişen sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar rastgele sekiz gruba ayrılmıştır (Çizelge 3.1). Sıçanlara içebildikleri kadar su yiyebildikleri kadar yem verilmiştir. Obez gruplardaki sıçanlar %60 yağ içeren yüksek yağlı diyet ve obez olmayan gruplardaki sıçanlar ise %12 yağ içeren standart sıçan yem ile beslenmiştir.

#### Çizelge 3.1. DeneY grupları

##### **DeneY ve kontrol grupları**

- 
- Grup 1:** Kontrol (standart diyet)  
**Grup 2:** Kontrol + AdM (standart diyet)  
**Grup 3:** Kontrol + Resveratrol (standart diyet)  
**Grup 4:** Kontrol + AdM + Resveratrol (standart diyet)  
**Grup 5:** Kontrol obez (yüksek yağ diyeti)  
**Grup 6:** Obez + AdM (yüksek yağ diyeti)  
**Grup 7:** Obez + Resveratrol (yüksek yağ diyeti)  
**Grup 8:** Obez + AdM + Resveratrol (yüksek yağ diyeti)
- 

Sıçanlar deneYin başında, sonunda, haftada bir kez tartılmış ve ağırlıkları kaydedilmiştir.

#### 3.2 Obezite Oluşturulması

Obez gruplardaki sıçanlar için %60 yüksek yağ diyeti yemleri hazır olarak alınmıştır (TestDiet DIO Rodent Purified Diet w/60% Energy From Fat-Blue, St. Louis USA, Çizelge 3.2, 3.3). Sıçanlar 4 ay boyunca bu yemle beslenerek obezitenin oluşması sağlanmıştır. Obezite sağlandıktan sonra deneY gruplarına AdM ve resveratrol uygulanmış ve uygulama sonuna kadar bu yemle beslenmiştir.

**Çizelge 3.2.** Hazır yem içeriği

<b>Hazır Yem İçeriği</b>
Domuz Yağı
Kazein – Test Edilmiş Vitamin
Maltodekstrin
Sükroz
Toz Selüloz
Soya Yağı
Potasyum Sitrat, Tribazik
Monohidrat
Kalsiyum Fosfat
Diyetle Oluşturulan Obezite Mineral Karışımı
AIN-76A Vitamin Karışımı
Kalsiyum Karbonat
L-Sistin
Kolin Bitartrat
FD&C Blue 1-5516 Lake

**Çizelge 3.3.** Yüksek yağ diyeti besinsel profili

<b>Protein</b>	<b>%23.1</b>	<b>Mineraller</b>		
Arjinin	%0.90	Kalsiyum	%0.79	
Histidin	%0.67	Fosfor	%0.59	
İzolösin	%1.24	Fosfor (mevcut)	%0.59	
Lösin	%2.24	Potasyum	%0.77	
Lizin	%1.88	Magnezyum	%0.07	
Methionin	%0.67	Sodyum	%0.15	
Sistin	%1.24	Klorür	%0.25	
Tirozin	%1.31	Florin	1.2 ppm	
Threonin	%1.00	Demir	64 ppm	
Triptofan	%0.29	Çinko	46 ppm	
Valin	%1.47	Manganez	76 ppm	
Alanin	%0.71	Bakır	7.8 ppm	
Aspartik Asit	%1.66	Kobalt	0.0 ppm	
Glutamik Asit	%5.28	İyot	0.27 ppm	
Glisin	%0.50	Krom (eklenen)	2.6 ppm	
Prolin	%3.04	Molibden	2.11 ppm	
Serin	%1.43	Selenyum	0.29 ppm	
Taurin	%0.00	<b>Vitaminler</b>		
<b>Yağ</b>	<b>%34.9</b>	Vitamin A	5.2 IU/g	
Kolesterol	301 ppm	Vitamin D3	1.3 IU/g	
Linoleik Asit	%4.07	Vitamin E	67.3 IU/g	
Linolenik Asit	%0.39	Vitamin K	0.65 ppm	
Arakidonik Asit	%0.06	Tiyamin Hidroklorit	7.8 ppm	
Omega-3 Yağ Asitleri	%0.39	Riboflavin	8.7 ppm	
Toplam Monosature	%14.00	Niasin	39 ppm	
Yağ Asitleri				
<b>Lif (maksimum)</b>	<b>%6.5</b>	Pantotenik Asit	21 ppm	
<b>Karbonhidrat</b>	<b>%25.9</b>	Folik Asit	2.8 ppm	
<b>Enerji (kcal/g)<sup>2</sup></b>	<b>%5.10</b>	Piridoksin	7.5 ppm	
<b>Katnak</b>	<b>Kcal</b>	<b>%</b>	Biotin	0.3 ppm
Protein	0.924	8.1	Vitamin B12	18 mcg/kg
Yağ (eter özütü)	3.140	61.6	Kolin Klorür	1.290 ppm
Karbonhidratlar	1.035	20.3	Askorbik Asit	0.0 ppm

### 3.3 Adrenomedullin ve Resveratrol Uygulaması

Adrenomedullin (Alfa Aesar Adrenomedullin 1-50 Rat, Karlsruhe Germany, moleküler ağırlık: 5729.40) distile deiyonize su içerisinde çözülerek uygulama gruplarına gün aşırı bir kez, 4 hafta süreyle 2.5 nmol/kg intraperitoneal (i.p.) olarak enjekte edilmiştir.

Resveratrol (Sigma) distile deiyonize su içerisinde çözülerek uygulama gruplarına gün aşırı bir kez, 4 hafta süreyle 10 mg/kg i.p. olarak enjekte edilmiştir.

Son uygulamalardan bir gün sonra sıçanlardan dokular alınmıştır.

### 3.4 Dokuların Toplanması

Anestezi işlemi için anestezi madde olarak 1500 µL/kg ketamin ve 500 µL/kg ksilazin intramüsküler (i.m.) olarak uygulanmıştır. Sıçanların bayılmaları, arka ayakları pensetle sıkıştırılarak ve bıyıklarının düşmesi gözlenerek kontrol edilmiştir. Anesteziye giren sıçanların abdomenlerinden bir kesik açılarak göğüs kafesine kadar kesilmiştir. Göğüs kafesleri de açılarak vena kava kesilmiştir. Kalbin sağ ve sol karıncıklarına 5'er mL serum fizyolojik enjekte edilerek perfüzyon işlemi tamamlanmıştır.

Perfüzyon işleminden sonra sıçanın kalbi çıkarılarak ötenazi yapılmıştır. Barsaklar kaldırılarak retroperitoneal beyaz yağ dokusu toplanmıştır. Doku serum fizyolojikle yıkanarak etiketli aliminyum folyolara sarılmıştır. Sıçanın dorsal kısmı traş edilmiş, kesik açılarak interskapüler kahverengi yağ dokusu toplanmıştır. Doku serum fizyolojikle yıkanarak etiketli aliminyum folyolara sarılmıştır. Dokular toplandıktan hemen sonra sıvı azot içerisinde atılmıştır. Diseksiyon işlemleri bittikten sonra dokular sıvı azottan çıkarılarak sonraki basamaklar için -40 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.5 Dokuların Homojenizasyonu

Homojenizasyon işlemi için 100 mg doku tarası alınmış 1.5 mL mikrosantrifüj tüplerine konularak tartılmıştır. Tüplerin içine 5 adet 3.2 mm çapında paslanmaz çelik boncuk ilave edilerek vorteksle dokuların parçalanması sağlanmıştır. QIAzol Lysis Reagent (Qiagen)'dan önce 200 µL eklenerek vortekslenmiş, dokular iyice homojenize olduktan sonra ise 1 mL'ye tamamlanmıştır. Homojenat RNA ve protein izolasyonu için temiz 2 mL mikrosantrifüj tüplere konmuştur.

### 3.6 RNA İzolasyonu

Deneyde kullanılacak olan bütün tüpler otoklavlanmış ve kullanmadan önce dietil polikarbonatlı su ile yıkanmıştır. Homojenattan RNA izolasyonu Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit ile üreticinin talimatlarına göre yapılmıştır:

1. Homojenat oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.
2. 200  $\mu$ L kloroform eklenmiştir. Tüpün kapağı iyice kapatılarak 15 saniye kuvvetlice çalkalanmıştır.
3. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletilmiştir.
4. 12,000  $xg$ 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra örnek üç faza ayrılmıştır: en üst renksiz RNA içeren aköz faz, beyaz ara faz ve en alt kırmızı organik faz.
5. Aköz faz yeni 1.5 mL mikrosantrifüj tüpe alınmıştır. Geri kalan fazlar protein izolasyonu için +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Bir hacim (yaklaşık 600  $\mu$ l) %70 etanol eklenerek vortekslenmiştir.
6. 700  $\mu$ l örnek 2 mL toplama tüpündeki RNeasy mini spin kolona uygulanmıştır. Kolonun kapağı yavaşça kapatılmıştır. 8500  $xg$ 'de oda sıcaklığında 15 saniye santrifüj edilmiştir. Kolondan geçenler atılmıştır.
7. Kalan aköz faz da RNeasy Mini spin kolona uygulanarak 6. basamak tekrar edilmiştir. Kolondan geçenler atılmıştır.
8. 700  $\mu$ L Buffer RW1 RNeasy spin kolona eklenmiştir. Kapağı yavaşça kapatılmıştır. 8500  $xg$ 'de 15 saniye santrifüj edilerek membran yıkanmıştır. Kolondan geçenler atılmıştır.
9. RNeasy spin kolona 500  $\mu$ L Buffer RPE eklenmiştir. Kapağı yavaşça kapatılmıştır. 8500  $xg$ 'de 15 saniye santrifüj edilerek membran yıkanmıştır. Kolondan geçenler atılmıştır.
10. RNeasy spin kolona 500  $\mu$ L Buffer RPE eklenmiştir. Kapağı yavaşça kapatılmıştır. 8500  $xg$ 'de 2 dakika santrifüj edilerek membran yıkanmıştır. Kolondan geçenler atılmıştır.
11. Kolon 14,000  $xg$ 'de 1 dakika santrifüj edilerek Buffer RPE ve diğer kalıntılar kolondan uzaklaştırılmıştır.
12. Kolon yeni 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. 40  $\mu$ L RNase-free su doğrudan kolon membranına eklenmiştir. Kolon kapağı

yavaşça kapatılmıştır. 8500 xg'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA elüe edilmiştir.

13. Kolon yeni 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. 40 µL RNase-free su doğrudan kolon membranına eklenmiştir. Kolon kapağı yavaşça kapatılmıştır. 8500 xg'de 1 dakika santrifüj edilerek ikinci RNA elüt elde edilmiştir.

Örneklerin 260 nm dalga boyunda RNA konsantrasyonları; 260/280 nm oranıyla RNA saflığı ölçülmüştür (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, USA). RNA örnekleri diğer basamaklara kadar -40 °C'de saklanmıştır.

### **3.7 Protein İzolasyonu**

Protein izolasyonu Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit kullanıcılarının geliştirdiği bir protein izolasyon yöntemiyle izole edilmiştir.

#### **3.7.1 Solüsyonlar**

##### **Guanidin-etanol solüsyonu**

%95 etanolde 0.3 M guanidin hidroklorür çözülmüştür.

##### **Üre/DTT solüsyonu**

10 M üre ve 50 mM ditiyotritol (DTT) hazırlanmıştır. Bir miktar suda üre vorteksenerek çözülmüştür. DTT kullanmadan hemen önce tartılmış, az miktar suda çözülmüş ve vorteksenirken üreye eklenmiştir. Su ile son konsantrasyona tamamlanmıştır.

#### **3.7.2 Prosedür**

RNA izolasyonunun 5. basamağında ayrılan örneklerden protein izolasyonu yapılmıştır:

1. Fazlara 0.3 mL %100 etanol eklenmiştir. Dikkatlice alt üst edilerek karıştırılmıştır.
2. Oda sıcaklığında (20-25 °C) 3 dakika inkübe edilmiştir.
3. 2000 xg'de 4 °C'de 2 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür.
4. Protein içeren süpernatant 2 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
5. 1.5 mL izopropanol eklenmiştir. 15 saniye alt üst edilerek protein çöktürülmüştür.
6. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir.

7. 12,000 xg'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır.
8. Protein içeren pelete 2 mL guanidin-etanol solüsyonu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.
9. 7500 xg'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır.
10. 8. ve 9. basamaklar iki kere tekrarlanmıştır.
11. 2 mL %100 etanol eklenerek vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.
12. 7500 xg'de oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır.
13. Pelet 10 dakika havada kurutulmuştur.
14. 50 µL üre/DTT solüsyonu eklenerek pipet ucuyla pelet çözölmüştür.
15. 450 µL üre/DTT solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.
16. 95 °C'de 3 dakika inkübe edildikten sonra buza konmuştur. Buzda inkübasyon esnasında kısa aralıklarla 30 kere sonifiye edilmiştir.
17. 10,000 xg'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni 1.5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.

Bradford yöntemiyle protein konsantrasyonları; 260/280 nm oranıyla protein saflığı ölçölmüştür (BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer, USA). Protein örnekleri diğere basamaklara kadar -40 °C'de saklanmıştır.

### 3.8 cDNA Sentezi

1. İlk cDNA zincir sentezi hazırlık aşaması için aşağıdaki karışım (Çizelge 3.4) (PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit, Takara Bio Inc.) hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.4.** cDNA hazırlık karışımı

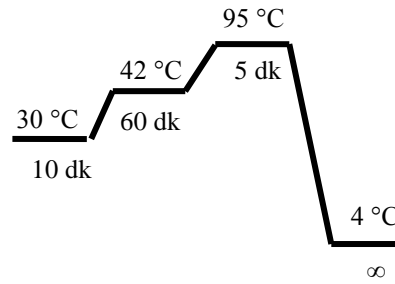
Bileşenler	Stok konsantrasyon	1 tüp (µL)	Son konsantrasyon
RNasız dH <sub>2</sub> O		2	
Oligo (dT) Primer	50 µM	1	5 µM
dNTP	10 mM (her biri)	1	1 mM
Total RNA		6	<5 µg
<b>Toplam hacim</b>		<b>10</b>	

2. Karışım 65 °C’de 5 dakika inkübe edilmiştir (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems) ve sonra hemen buza konulmuştur.
3. İnkübasyondan sonra sentezlenen ilk cDNA zincirine cDNA sentezi karışımı (Çizelge 3.5) (PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit, Takara Bio Inc.) eklenmiştir.

**Çizelge 3.5.** cDNA sentezi karışımı

Bileşenler	Stok konsantrasyon	1 tüp (µL)	Son konsantrasyon
Kalıp RNA Primer Karışımı (2. aşamadan)		10	
PrimeScript Tamponu	5X	4	1X
RNaz inhibitör	40 U/ µL	0.5	20 U
Prime Script Revers transkriptaz	200 U/µL	1	200 U
RNazsız dH <sub>2</sub> O		4.5	
<b>Toplam hacim</b>		<b>20</b>	

4. Yavaşça karıştırılmıştır.
5. Reaksiyon karışımı 30 °C’de 10 dakika, 42 °C’de 60 dakika inkübe edilmiştir.
6. Daha sonra 95 °C’de 5 dakika inkübe edilerek enzim inaktive edilmiştir (Şekil 3.1) (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems) ve buzda soğutulmuştur.



**Şekil 3.1.** cDNA sentezi basamakları

### 3.9 Semi-kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

*Beta aktin* (Hwang vd., 2007), *AdM* (Li vd. 2006), *SIRT1* (Thakran vd., 2013) ve *VEGF-A* (Chen vd., 2012) primer dizileri önceki çalışmalardan elde edilmiştir (Çizelge 3.6) ve Primer 3 (Untergasser vd., 2012) programıyla kontrol edilmiştir.

Primerler Sentromer DNA Teknolojileri (İstanbul, Türkiye) tarafından sentezlenmiştir.

**Çizelge 3.6. Primerler**

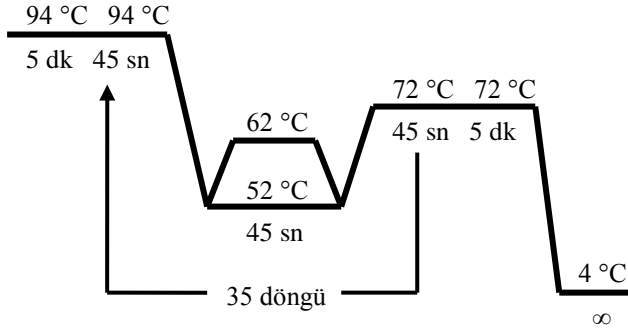
Gen	Primerler	Uzunluk	Tm	Ürün
<i>Beta</i>	İleri Primer 5'-GGAAATCGTGCGTGACATTA-3'	20 bp	56.54°C	183 bp
<i>aktin</i>	Ters Primer 5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3'	20 bp	58.72°C	
<i>AdM</i>	İleri Primer 5'-TTCAGCAGGGTATCGGAGC-3'	19 bp	59.18°C	615 bp
	Ters Primer 5'-CCGACTGTCAATGCTGCC-3'	19 bp	57.50°C	
<i>SIRT1</i>	İleri Primer 5'-CAGTGTCATGGTTCCTTTGC-3'	20 bp	57.29°C	104 bp
	Ters Primer 5'-CACCGAGGAACCTACCTGAT-3'	19 bp	55.85°C	
<i>VEGF-A</i>	İleri Primer 5'-CCATGAACTTTCTGCTCTCTTG-3'	22 bp	45.45°C	448 bp
	Ters Primer 5'-GGTGAGAGGTCTAGTTCCCGAA-3'	22 bp	54.55°C	

Primerlerin optimum sıcaklıklarını belirlemek amacıyla gradient PZR gerçekleştirilmiştir. PZR karışımı (Çizelge 3.7) hazırlandıktan sonra ısı düzenleyici (T100™ Thermal Cycler, Bio Rad)'deki kuyucuklar *Beta aktin* için 61-50 °C'ye; *AdM*, *VEGF-A* ve *SIRT1* için 52-62 °C'ler arası ayarlanmıştır (Şekil 3.2).

**Çizelge 3.7. PZR karışımı**

Bileşenler	Stok konsantrasyon	1 tüp (µL)	Son konsantrasyon
dH <sub>2</sub> O		6.1	
Tampon	10X	1	1X
dNTP	10 mM	0.8	0.8 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0.7	1.75 mM
Forward Primer	200 nmol	0.1	20 nmol
Reverse Primer	200 nmol	0.1	20 nmol
Taq Polymerase	5 U/µL	0.1	0.5 U
cDNA		1	
<b>Toplam hacim</b>		<b>10</b>	





62.0 °C	61.2 °C	60.0 °C	58.1 °C	55.8 °C	53.9 °C	52.7 °C	52.0 °C
---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---------

**Şekil 3.2.** *AdM*, *VEGF-A* ve *SIRT1* için gradient PZR basamakları

PZR reaksiyonları için 94 °C’de 5 dakika ön denatürasyon basamağından sonra aşağıdaki basamaklar gerçekleştirilmiştir:

**DNA denatürasyonu:** 94 °C’de 45 saniye;

**Primer bağlanması:** *Beta aktin* için 52 °C’de; *AdM* ve *VEGF-A* için 62 °C’de; *SIRT1* için 58.8 °C’de 45 saniye;

**Uzama:** 72 °C’de 45 saniye.

Bu basamaklar 35 döngüde tekrarlanmıştır. Uzaması tamamlanmayan ve eksik kalan zincirler için 72 °C’de 5 dakika son uzama basamağı gerçekleştirilmiştir. Amplikonlar 4 °C’ye kadar soğutulmuştur. Etidyum bromür içeren %1.5 agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Quantum ST4, Vilber Lourmat). Image J (NIH) programıyla bant kalınlıkları ölçülmüştür. *Beta aktin* geni internal kontrol olarak kullanılmıştır. Diğer genler bu genle oranlanmıştır.

### 3.10 Western Blot

#### 3.10.1 Solüsyonlar ve reaktifler

**Yükleme tamponu: 6x Laemmli tampon**

%12 SDS

%20 gliserol

%0.01 bromfenol mavi

0.375 M Tris-HCl

pH 6.8’e ayarlanmıştır. Kullanmadan önce 1:8 oranında 2-merkaptetanol eklenmiştir.

**Yürütme tamponu: Tris/Glisin/SDS**

25 mM Tris

190 mM glisin

%0.1 SDS

**%12'lik Ayırma Jeli**

dH<sub>2</sub>O 4.9 mL

%30 akrilamid/bisakrilamid 6.0 mL

1.5 M tris-Cl (pH 8.8) 3.8 mL

%10 SDS 150 µL

%10 APS 150 µL

TEMED 6 µL

**%5 Yapıştırma Jeli**

dH<sub>2</sub>O 3.4 mL

%30 akrilamid/bisakrilamid 830 µL

1 M tris-Cl (pH 6.8) 630 µL

%10 SDS 50 µL

%10 APS 50 µL

TEMED 10 µL

**Transfer tamponu**

25 mM Tris

190 mM glisin

%20 metanol

**Coomassie Blue Boyası**

%0.1 Coomassie Brilliant Blue

%10 asetik asit

%50 metanol

%40 dH<sub>2</sub>O

### **Ponceau S boyama tamponu**

%0.2 (w/v) Ponceau S

%5 glasiyal asetik asit

### **Tween 20 tamponu ile Tris-tamponlu tuz (TBST)**

20 mM Tris, pH 7.5

150 mM NaCl

%0.1 Tween 20

### **Bloklama tamponu**

TBST'de %5 yağsız süt tozu

## **3.10.2 Prosedür**

### **Örnek hazırlama**

#### **Jel elektroforeziyle proteinleri ayırma**

1. 30 µg protein örnekleri 6X Laemmlı tamponla karıştırıldı ve 95 °C'de 20 dakika denatürasyon yapılmıştır.
2. Hedef proteinlerin molekül büyüklüklerine uygun %12'lik SDS-PAGE jelin kuyucuklarına moleküler ağırlık markırıyla birlikte protein örnekleri yüklenmiştir (Bio Rad Mini Protean II).
3. Jel 50 V'de 5 dakika yürütülmüştür.
4. Voltaj 100 V'a çıkarılarak yürütme 2 saat içerisinde tamamlanmıştır.

#### **Jeldeki proteinlerin membrana transferi**

1. Jel 1x transfer tamponunda 15 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir.
2. Poliviniliden diflorür (PVDF) membran 5 dakika metanolde aktive edilmiştir.
3. Transfer sandviçi (katot-sünger-filtre kağıdı-membran-jel-filtre kağıdı-sünger-anot) arasında hiç hava kalmayacak şekilde hazırlanmıştır. Blot katoda, jel ise anota yerleştirilmiştir.
4. 4 °C'de 10 mA'de gece boyu ıslak sistem transfer sağlanmıştır (Bio Rad Mini Trans-Blot® Cell).

### Antikor inkübasyonu

1. Blot transfer kalitesini kontrol etmek için Ponceau S solüsyonuyla boyanmıştır. Jel ise Coomassie Blue boyası ile çalkalayıcıda 1 saat boyanmıştır.
2. Ponceau S boyası TBST ile 5 kez 5'er dakika yıkanmıştır.
3. Bloklama solüsyonu ile oda koşullarında çalkalayıcıda 1 saat bloklanmıştır.
4. Beta aktin primer antikor 1:3000, AdM primer antikor 1:1000, SIRT1 primer antikor 1:500, VEGF-A primer antikor 1:500 oranında bloklama tamponuyla dilüe edilmiştir (Çizelge 3.8). Hedef proteinin primer antikoruyla çalkalayıcıda 4 °C'de gece boyu inkübe edilmiştir.
5. Blot TBST ile 7 kere 5'er dakika yıkanmıştır.
6. 1:10000 oranında HRP-konjuge sekonder antikor TBST ile dilüe edilmiş ve blot sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.
7. Blot TBST ile 7 defa 5'er dakika yıkanmıştır.

Çizelge 3.8. Antikorlar

Protein	Primer Ab	Dilüsyon	Marka	Sekonder Ab	Dilüsyon	Marka
Beta aktin	Poliklonal tavşan IgG	1:3000	Santa Cruz sc-130656	Keçi anti-tavşan IgG	1:10000	Santa Cruz sc-2004
AdM	Poliklonal tavşan IgG	1:1000	Abcam ab190819	Keçi anti-tavşan IgG	1:10000	Santa Cruz sc-2004
SIRT1	Monoklonal fare IgG	1:500	Santa Cruz sc-74465	Keçi anti-fare IgG	1:10000	Santa Cruz sc-2005
VEGF-A	Monoklonal fare IgG	1:500	Santa Cruz sc-7269	Keçi anti-fare IgG	1:10000	Santa Cruz sc-2005

### Görüntüleme ve veri analizi

1. Kemoluminesans substrat blota uygulanmıştır.
2. CCD kameralı görüntüleme cihazı (ChemiDoc<sup>TM</sup> MP Imaging System, BioRad) ile sinyaller görüntülenmiştir.

Bant yoğunlukları Image J (NIH) programıyla ölçülmüştür. Beta aktin internal kontrol olarak kullanılmıştır. Diğer proteinler bu proteinle oranlanmıştır.

### **Sıyırma (stripping) ve tekrar proplama**

1. Sıyırma tamponu 50 °C'ye kadar ısıtılmıştır.
2. Membrana eklenmiştir. Hafifçe çalkalayarak 50 °C'de 45 dakikaya kadar inkübe edilmiştir.
3. Blot akan su altında 1 saat yıkanmıştır.
4. Membran temiz bir kaba aktarılmış ve TBST ile 5'er dakika 5 kez yıkanmıştır.
5. TBST'de %3'lük yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklanmıştır.
6. Primer antikor solüsyonuyla 4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir.
7. Blot TBST ile 3-5 kere 5'er dakika yıkanmıştır.
8. HRP-konjuge sekonder antikor solüsyonuyla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.
9. Blot TBST ile 3-5 kere 5'er dakika yıkanmıştır.

### **3.11 İstatistiksel Analizler**

Gruplar arası farklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc LCD testi (IBM SPSS Statistics Version 24) ile hesaplanmıştır ( $p<0.05$ ).

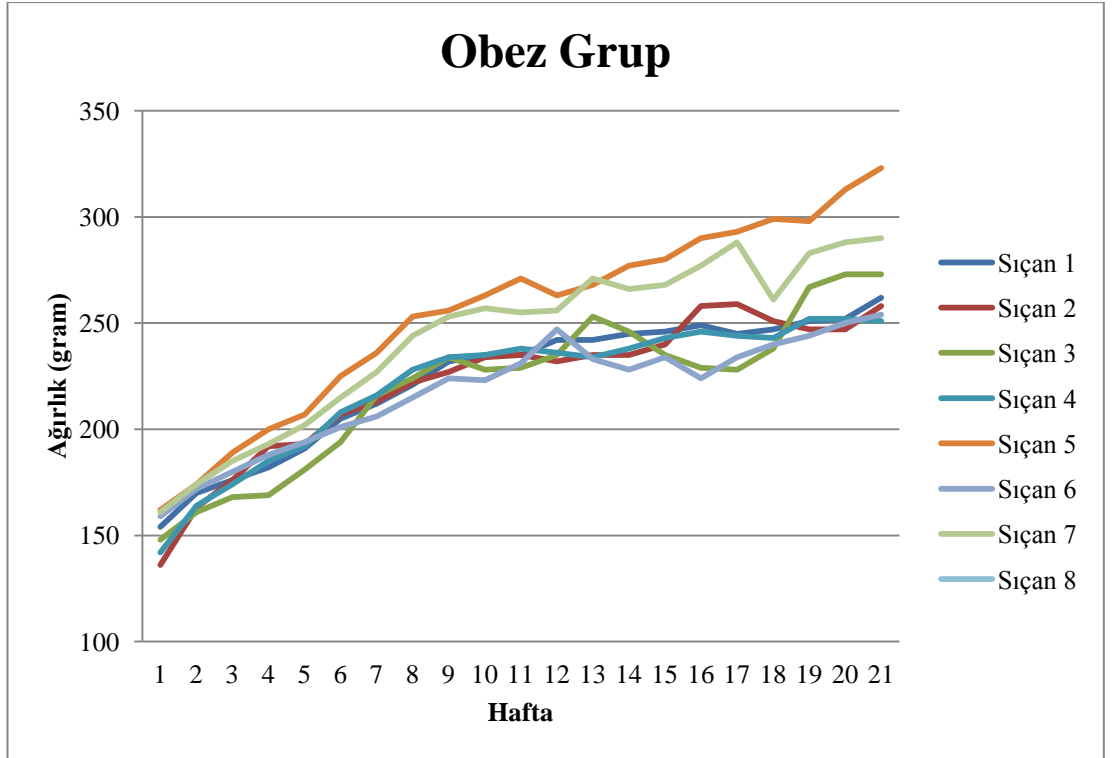
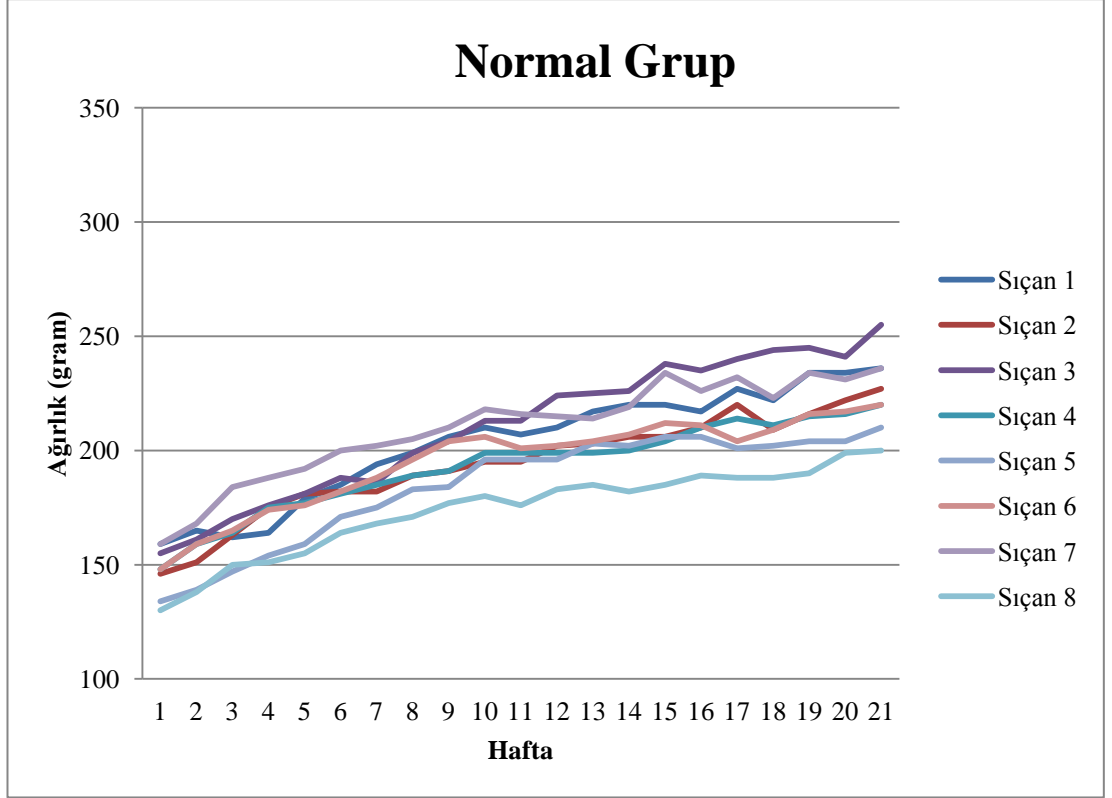
## 4 ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1 Obezitenin Sağlanması

Yüksek yağ diyeti ile beslenen gruplar, standart yemle beslenen normal gruplara göre %21 oranında fazla ağırlık kazanmışlardır (Çizelge 4.1, Şekil 4.1). Böylece obezite için amaçlanan kilo artışı sağlanmıştır.

**Çizelge 4.1.** Kilo artışı (*N*, sayı; *X*, ortalama; *SS*, standart sapma)

Grup	<i>N</i>	<i>X</i>	<i>SS</i>	%
Normal	8	225.50	17.08	100.00
Obez	8	274.13	24.05	121.56



**Şekil 4.1.** Normal ve obez gruplarda kilo artışı

## 4.2 Semi-kantitatif PZR Bulguları

Semi- kantitatif PZR yöntemiyle gen ifadesi tayini için önce örneklerden RNA izole edilmiş ve konsantrasyonları ölçülmüştür. Değerler aşağıdaki gibidir (Çizelge 4.2).

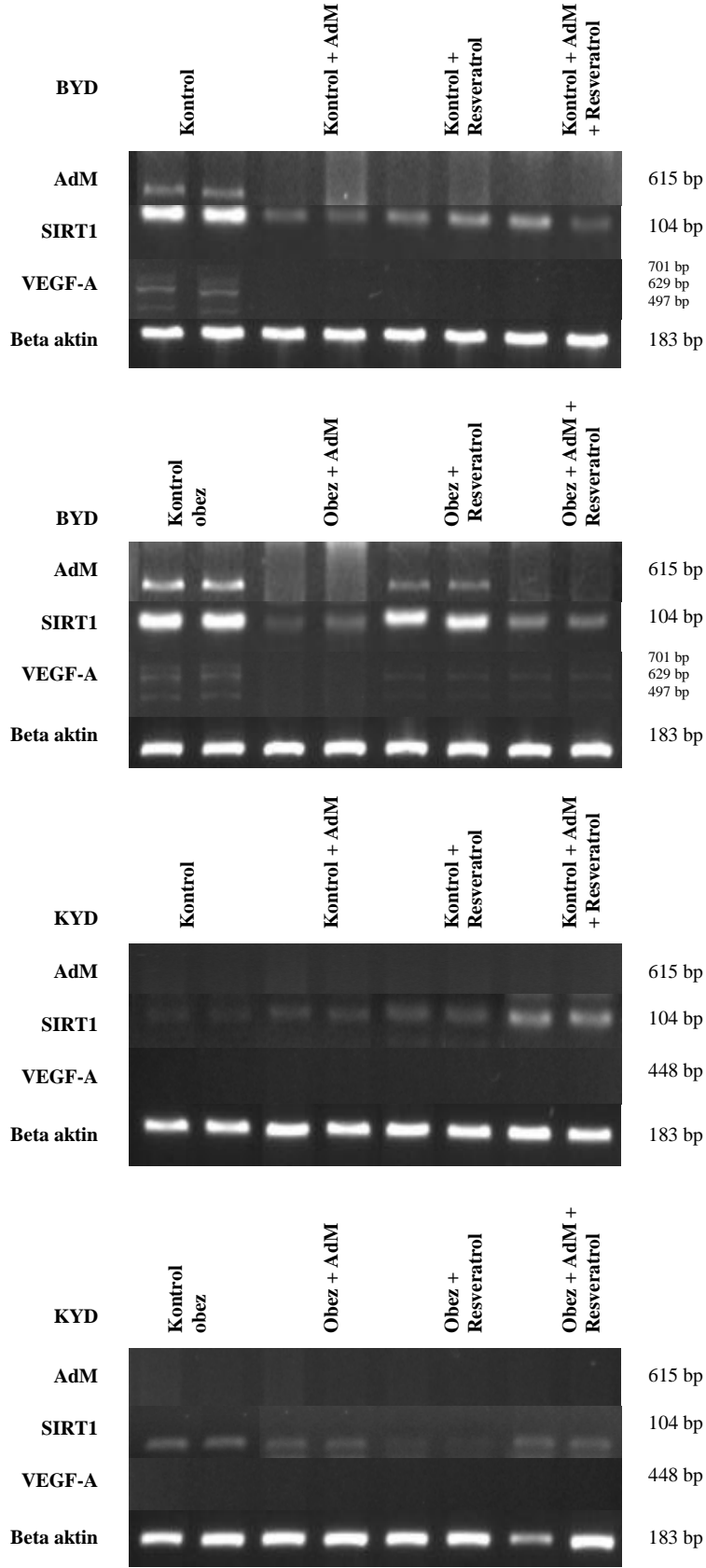
Çizelge 4.2. RNA konsantrasyonları

Grup	Sıçan	RNA konsantrasyonu (µg/mL)	
		BYD	KYD
Kontrol	1	410.562	2456.485
	2	336.638	1077.52
Kontrol + AdM	3	652.194	1849.065
	4	710.669	1047.925
Kontrol + Resveratrol	5	652.737	1608.961
	6	523.721	973.412
Kontrol + AdM + Resveratrol	7	203.707	941.939
	8	337.689	1833.333
Kontrol obez	9	248.244	2305.778
	10	208.389	2038.105
Obez + AdM	11	203.650	1240.528
	12	288.783	1420.260
Obez + Resveratrol	13	276.408	2309.427
	14	147.089	1289.537
Obez + AdM + Resveratrol	15	216.187	2035.156
	16	256.981	2207.776



Elde edilen RNA'lerden cDNA sentezlenerek PZR yapılmıştır. *Beta aktin* amplikonları 183 bp; *AdM* amplikonları 615 bp; *SIRT1* amplikonları 104 bp ve *VEGF-A* amplikonları 448 bp uzunluğundadır. *VEGF-A* primeri genin bazı transkriptlerini de çoğaltma yeteneğindedir. Bundan dolayı BYD kontrol, kontrol obez, obez + resveratrol ve obez + resveratrol + AdM gruplarında *VEGF-A* transkript varyant 1 (701 bp, *VEGF-A*<sub>188</sub> mRNA), *VEGF-A* transkript varyant 2 (629 bp, *VEGF-A*<sub>164</sub> mRNA) ve *VEGF-A* transkript varyant 3 (497 bp, *VEGF-A*<sub>120</sub> mRNA) elde edilmiştir (Şekil 4.2). KYD dokusunda *AdM* ve *VEGF-A* gen ifadesi saptanamamıştır.

PZR sonucu elde edilen bantların Image J programında ölçülmesiyle elde edilen değerler, internal kontrol *beta aktin* ile normalleştirilmiştir. Genlerin normal gruplarındaki değerleri %100 kabul edilerek gruplar arası farklar ANOVA ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.3, 4.4, 4.5). Ayrıca çıkan değerler grafik olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Semi-kantitatif PZR jel görüntüleri

**Çizelge 4.3.** BYD AdM, SIRT1 semi- kantitatif PZR ANOVA sonuçları

<i>N, X, SS Değerleri</i>					<i>ANOVA Sonuçları</i>		
<b>Parametre</b>	<b>Grup</b>	<i>N</i>	<i>X</i>	<i>SS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<b>Anlamlı Fark</b>
<b>AdM BYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	839.931	0.00	(Kontrol obez) -
	Kontrol + AdM*	2	0.00	0.00			(Kontrol) -(Obez +
	Kontrol + Resveratrol*	2	0.00	0.00			Resveratrol) - (Obez
	Kontrol + AdM +	2	0.00	0.00			+ AdM +
	Resveratrol*						Resveratrol) - (Obez
	Kontrol obez*	2	216.82	8.22			+ AdM) - (Kontrol +
	Obez + AdM*	2	0.00	0.00			AdM + Resveratrol) -
	Obez + Resveratrol*	2	76.90	7.13			(Kontrol + AdM) -
	Obez + AdM +	2	0.00	0.00			(Kontrol +
Resveratrol*				Resveratrol)			
<b>SIRT1 BYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	65.586	0.00	(Obez + Resveratrol)
	Kontrol + AdM*	2	44.19	3.48			-(Kontrol obez) -
	Kontrol + Resveratrol*	2	114.73	3.38			(Kontrol +
	Kontrol + AdM +	2	87.04	6.11			Resveratrol) - (Obez
	Resveratrol*						+ AdM) - (Kontrol) -
	Kontrol obez*	2	137.01	5.63			(Obez + AdM +
	Obez + AdM*	2	105.02	4.43			Resveratrol) -
	Obez + Resveratrol*	2	166.59	13.39			(Kontrol + AdM +
	Obez + AdM +	2	99.91	4.55			Resveratrol) -
Resveratrol*				(Kontrol + AdM)			

“\*”, anlamlı fark bulunan gruplar; *N*, sayı; *X*, ortalama; *SS*, standart sapma; *F*, *F* testi;  $p < 0.05$

**Çizelge 4.4.** BYD *VEGF-A* semi- kantitatif PZR ANOVA sonuçları

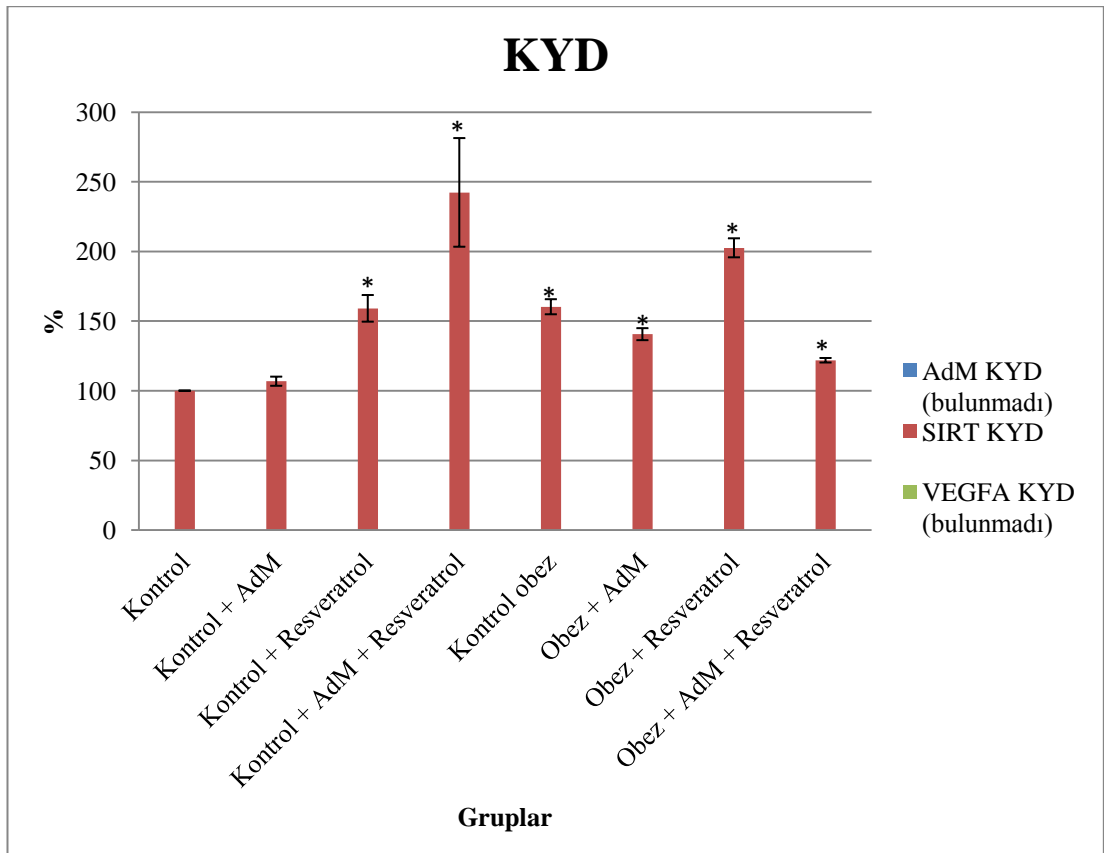
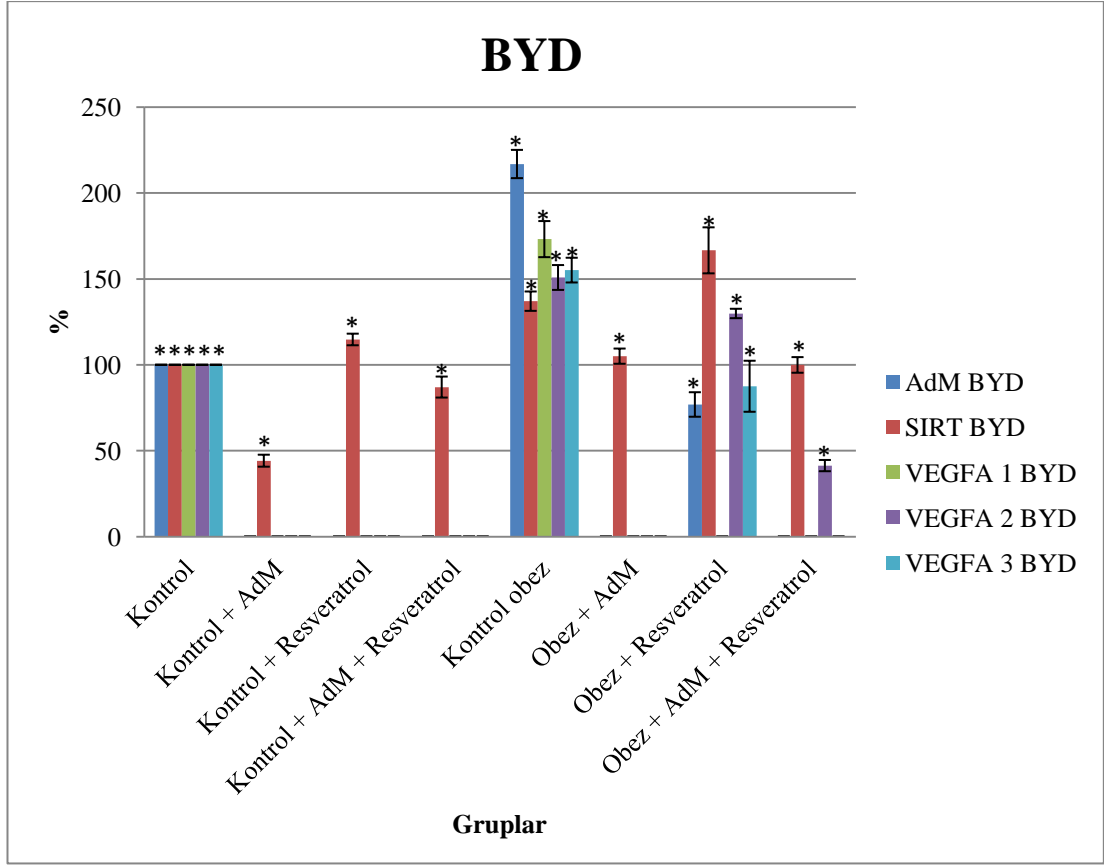
		<i>N, X, SS</i> Değerleri			ANOVA Sonuçları		
Parametre	Grup	<i>N</i>	<i>X</i>	<i>SS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	Anlamlı Fark
<b>VEGF-A</b> <b>transkript</b> <b>varyant 1</b> <b>BYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	634.387	0.00	(Kontrol obez) - (Kontrol) - (Obez + AdM + Resveratrol) - (Kontrol + AdM) - (Kontrol + Resveratrol) - (Obez + Resveratrol) - (Kontrol + AdM + Resveratrol) - (Obez + AdM)
	Kontrol + AdM*	2	0.00	0.00			
	Kontrol + Resveratrol*	2	0.00	0.00			
	Kontrol + AdM + Resveratrol*	2	0.00	0.00			
	Kontrol obez*	2	173.13	10.50			
	Obez + AdM*	2	0.00	0.00			
	Obez + Resveratrol*	2	0.00	0.00			
	Obez + AdM + Resveratrol*	2	0.00	0.00			
<b>VEGF-A</b> <b>transkript</b> <b>varyant 2</b> <b>BYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	942.769	0.00	(Kontrol obez) - (Obez + Resveratrol) -(Kontrol) - (Obez + AdM) - (Obez + AdM + Resveratrol) - (Kontrol + AdM) - (Kontrol + Resveratrol) - (Kontrol + AdM + Resveratrol)
	Kontrol + AdM*	2	0.00	0.00			
	Kontrol + Resveratrol*	2	0.00	0.00			
	Kontrol + AdM + Resveratrol*	2	0.00	0.00			
	Kontrol obez*	2	150.80	7.23			
	Obez + AdM*	2	0.00	0.00			
	Obez + Resveratrol*	2	129.86	2.73			
	Obez + AdM + Resveratrol*	2	41.34	3.28			
<b>VEGF-A</b> <b>transkript</b> <b>varyant 3</b> <b>BYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	227.016	0.00	(Kontrol obez) - (Kontrol) - (Obez + Resveratrol) - (Kontrol + AdM) - (Obez + AdM) - (Kontrol + Resveratrol) - (Kontrol + AdM + Resveratrol) - (Obez + AdM + Resveratrol)
	Kontrol + AdM*	2	0.00	0.00			
	Kontrol + Resveratrol*	2	0.00	0.00			
	Kontrol + AdM + Resveratrol*	2	0.00	0.00			
	Kontrol obez*	2	155.09	7.19			
	Obez + AdM*	2	0.00	0.00			
	Obez + Resveratrol*	2	87.50	14.85			
	Obez + AdM + Resveratrol*	2	0.00	0.00			

“\*” , anlamlı fark bulunan gruplar; *N*, sayı; *X*, ortalama; *SS*, standart sapma; *F*, *F* testi; *p*<0.05

**Çizelge 4.5.** KYD semi- kantitatif PZR ANOVA sonuçları

Parametre	N, X, SS Değerleri			ANOVA Sonuçları			
	Grup	N	X	SS	F	p	Anlamlı Fark
<b>AdM KYD</b>	Kontrol	2	00.00	0.00	0.00		
	Kontrol + AdM	2	00.00	0.00			
	Kontrol + Resveratrol	2	00.00	0.00			
	Kontrol + AdM + Resveratrol	2	00.00	0.00			
	Kontrol obez	2	00.00	0.00			
	Obez + AdM	2	00.00	0.00			
	Obez + Resveratrol	2	00.00	0.00			
	Obez + AdM + Resveratrol	2	00.00	0.00			
<b>SIRT KYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	22.01	0.00	(Kontrol + AdM + Resveratrol) - (Obez + Resveratrol) - (Kontrol obez) - (Kontrol + Resveratrol) - (Obez + AdM) - (Obez + AdM + Resveratrol) - (Kontrol + AdM) - (Kontrol)
	Kontrol + AdM*	2	106.80	3.28			
	Kontrol + Resveratrol*	2	159.12	9.56			
	Kontrol + AdM + Resveratrol*	2	242.35	39.00			
	Kontrol obez*	2	160.27	5.41			
	Obez + AdM*	2	140.59	4.31			
	Obez + Resveratrol*	2	202.57	6.82			
	Obez + AdM + Resveratrol*	2	121.85	1.62			
<b>VEGF-A KYD</b>	Kontrol	2	00.00	0.00	0.00		
	Kontrol + AdM	2	00.00	0.00			
	Kontrol + Resveratrol	2	00.00	0.00			
	Kontrol + AdM + Resveratrol	2	00.00	0.00			
	Kontrol obez	2	00.00	0.00			
	Obez + AdM	2	00.00	0.00			
	Obez + Resveratrol	2	00.00	0.00			
	Obez + AdM + Resveratrol	2	00.00	0.00			

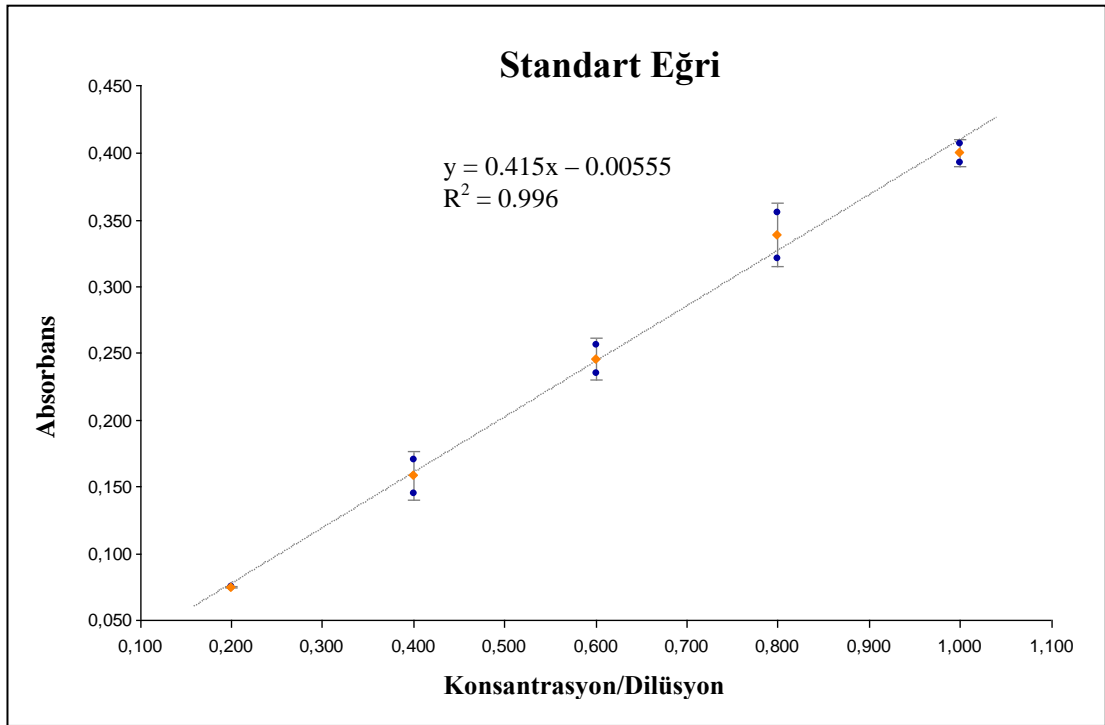
“\*” , anlamlı fark bulunan gruplar; N, sayı; X, ortalama; SS, standart sapma; F, F testi; p<0.05



Şekil 4.3. BYD ve KYD semi- kantitatif PZR grafikleri. \*, p<0.05

### 4.3 Western Blot Bulguları

Yağ dokusundan izole edilen proteinlerin Bradford yöntemiyle konsantrasyonları ölçülmüştür (Şekil 4.4, Çizelge 4.6). Proteinler SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra membrana transfer edilmiştir. Membranda beta aktin 43 kDa, AdM 20 kDa ve SIRT1 120 kDa seviyesindedir. VEGF-A monomeri 21 kDa, dimeri ise 42 kDa'dadır. Membranda VEGF-A monomeri seviyesinde bantlar görülmüştür (Şekil 4.5). Membranların görüntüleri Image J programıyla analiz edilmiştir. Elde edilen değerler, internal kontrol beta aktin ile normalleştirilmiştir. Proteinlerin normal gruplarındaki değerler %100 kabul edilerek gruplar arası farklar ANOVA ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.7, 4.8). Ayrıca çıkan değerler grafik olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.6).

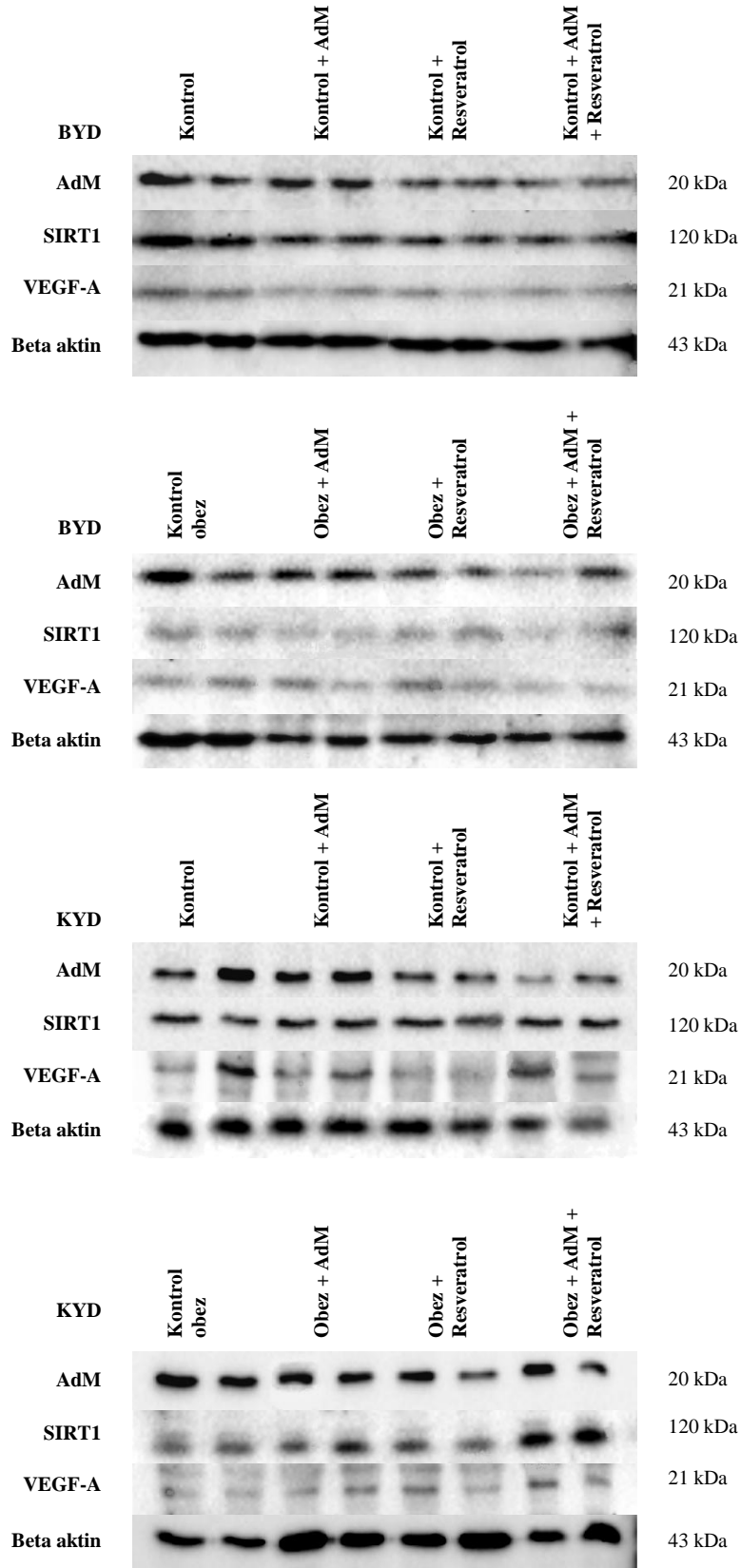


Şekil 4.4. Protein konsantrasyonu standart eğrisi

**Çizelge 4.6.** Protein konsantrasyonları

Grup	Sıçan	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	
		BYD	KYD
<b>Kontrol</b>	1	0.684	2.372
	2	0.639	1.970
<b>Kontrol + AdM</b>	3	0.790	2.472
	4	0.990	2.250
<b>Kontrol + Resveratrol</b>	5	0.647	2.140
	6	0.713	2.152
<b>Kontrol + AdM + Resveratrol</b>	7	0.624	2.168
	8	0.635	1.747
<b>Kontrol obez grubu</b>	9	0.562	2.635
	10	0.909	2.304
<b>Obez + AdM</b>	11	0.365	2.279
	12	0.532	2.415
<b>Obez + Resveratrol</b>	13	0.606	2.317
	14	0.869	2.043
<b>Obez + AdM + Resveratrol</b>	15	0.570	2.029
	16	0.646	2.051





Şekil 4.5. Western Blot membran görüntüleri

**Çizelge 4.7.** BYD Western ANOVA sonuçları

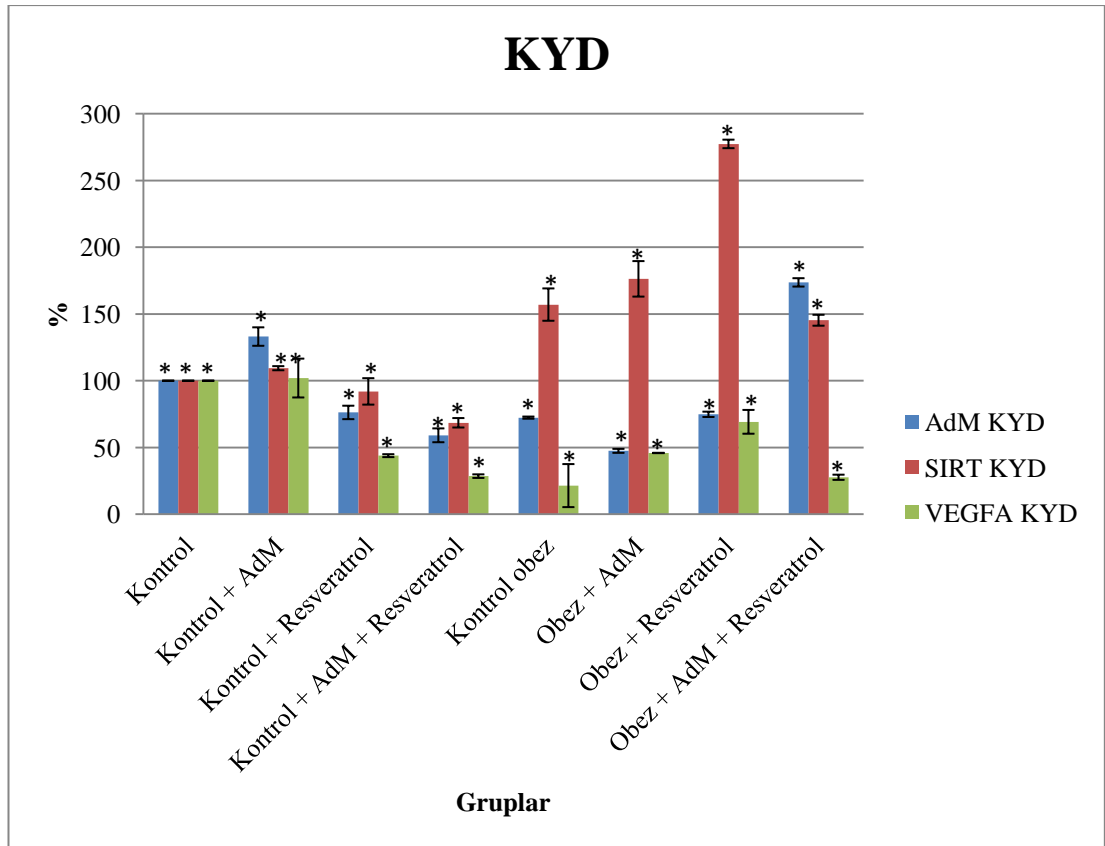
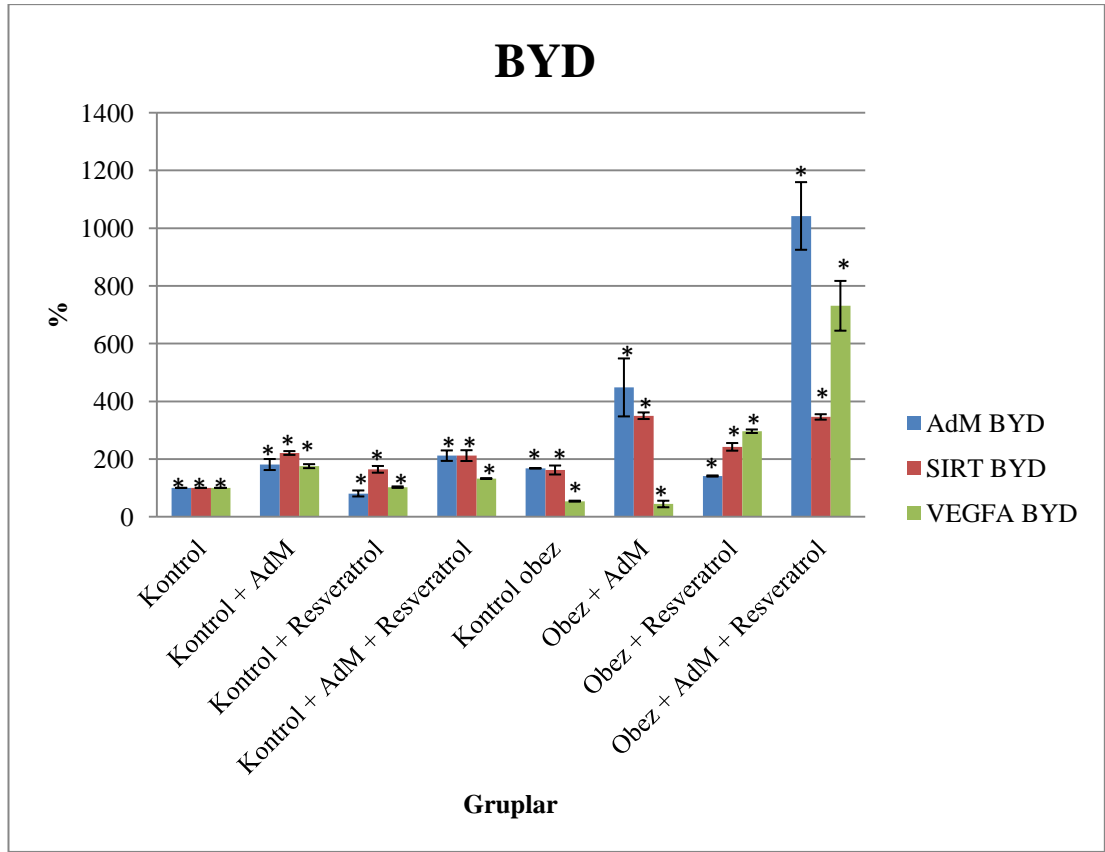
Parametre	N, X, SS Değerleri				ANOVA Sonuçları		
	Grup	N	X	SS	F	P	Anlamlı Fark
<b>AdM BYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	67.133	0.00	(Obez + AdM + Resveratrol) - (Obez + AdM) - (Kontrol + AdM + Resveratrol) - (Kontrol + AdM) - (Kontrol obez) - (Obez + Resveratrol) - (Kontrol) - (Kontrol + Resveratrol)
	Kontrol + AdM*	2	180.93	19.12			
	Kontrol + Resveratrol*	2	80.66	10.38			
	Kontrol + AdM + Resveratrol*	2	211.64	18.14			
	Kontrol obez*	2	167.75	8.63			
	Obez + AdM*	2	448.06	100.44			
	Obez + Resveratrol*	2	141.07	2.00			
	Obez + AdM + Resveratrol*	2	1042.29	117.21			
<b>SIRT BYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	105.997	0.00	(Obez + AdM) - (Obez + AdM + Resveratrol) - (Obez + Resveratrol) - (Kontrol + AdM) - (Kontrol + AdM + Resveratrol) - (Kontrol + Resveratrol) - (Kontrol obez) - (Kontrol)
	Kontrol + AdM*	2	220.92	6.61			
	Kontrol + Resveratrol*	2	164.25	11.67			
	Kontrol + AdM + Resveratrol*	2	211.82	18.71			
	Kontrol obez*	2	161.94	15.54			
	Obez + AdM*	2	350.02	11.38			
	Obez + Resveratrol*	2	242.11	13.28			
	Obez + AdM + Resveratrol*	2	345.85	9.36			
<b>VEGF-A BYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	67.133	0.00	(Obez + AdM + Resveratrol) - (Obez + Resveratrol) - (Kontrol + AdM) - (Kontrol + AdM + Resveratrol) - (Kontrol + Resveratrol) - (Kontrol) - (Kontrol obez) - (Obez + AdM)
	Kontrol + AdM*	2	175.32	6.90			
	Kontrol + Resveratrol*	2	102.52	2.62			
	Kontrol + AdM + Resveratrol*	2	132.31	0.69			
	Kontrol obez*	2	54.02	1.66			
	Obez + AdM*	2	44.12	11.32			
	Obez + Resveratrol*	2	296.27	6.11			
	Obez + AdM + Resveratrol*	2	730.95	86.26			

“\*”, anlamlı fark bulunan gruplar; N, sayı; X, ortalama; SS, standart sapma; F, F testi; p<0.05

**Çizelge 4.8.** KYD Western ANOVA sonuçları

Parametre	N, X, SS Değerleri			ANOVA Sonuçları			
	Grup	N	X	SS	F	P	Anlamlı Fark
<b>AdM KYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	243.127	0.00	(Obez + AdM + Resveratrol) - (Kontrol + AdM) - (Kontrol grubu) - (Kontrol + Resveratrol) - (Obez + Resveratrol) - (Kontrol obez grubu) - (Kontrol + AdM + Resveratrol) - (Obez + AdM + Resveratrol) - (Obez + AdM)
	Kontrol + AdM*	2	133.07	6.92			
	Kontrol + Resveratrol*	2	76.25	5.04			
	Kontrol + AdM + Resveratrol*	2	59.12	5.18			
	Kontrol obez*	2	72.36	0.80			
	Obez + AdM*	2	47.47	1.48			
	Obez + Resveratrol*	2	74.84	2.00			
	Obez + AdM + Resveratrol*	2	173.65	3.14			
<b>SIRT KYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	150.182	0.00	(Obez + Resveratrol) - (Obez + AdM) - (Kontrol obez grubu) - (Obez + AdM + Resveratrol) - (Kontrol + AdM) - (Kontrol grubu) - (Kontrol + Resveratrol) - (Kontrol + AdM + Resveratrol)
	Kontrol + AdM*	2	109.37	1.54			
	Kontrol + Resveratrol*	2	92.00	9.90			
	Kontrol + AdM + Resveratrol*	2	68.50	3.54			
	Kontrol obez*	2	157.02	12.12			
	Obez + AdM*	2	176.30	13.30			
	Obez + Resveratrol*	2	277.35	3.19			
	Obez + AdM + Resveratrol*	2	145.29	4.09			
<b>VEGF-A KYD</b>	Kontrol*	2	100.00	0.00	29.580	0.00	(Kontrol + AdM) - (Kontrol grubu) - (Obez + Resveratrol) - (Obez + AdM) - (Kontrol + Resveratrol) - (Kontrol + AdM + Resveratrol) - (Obez + Resveratrol) - (Obez + AdM + Resveratrol) - (Kontrol obez grubu)
	Kontrol + AdM*	2	102.00	14.55			
	Kontrol + Resveratrol*	2	43.88	1.09			
	Kontrol + AdM + Resveratrol*	2	28.55	1.34			
	Kontrol obez*	2	21.46	16.11			
	Obez + AdM*	2	45.90	0.13			
	Obez + Resveratrol*	2	69.22	8.91			
	Obez + AdM + Resveratrol*	2	27.69	1.95			

“\*””, anlamlı fark bulunan gruplar; N, sayı; X, ortalama; SS, standart sapma; F, F testi; p<0.05



Şekil 4.6. BYD ve KYD Western Blot grafikleri. \*,  $p < 0.05$

## 5 TARTIŞMA VE SONUÇ

### 5.1 BYD AdM Sonuçları

Kontrol grubu *AdM* gen ifadesi bakımından diğer gruplarla karşılaştırıldığında *AdM* gen ifadesi olan bütün gruplarda fark vardır ( $p<0.05$ ). Kontrol + AdM, kontrol + resveratrol, kontrol + AdM + resveratrol, obez + AdM ve obez + AdM + resveratrol gruplarında *AdM* ifadesi görülmemiştir. *AdM* geninin promotorunda bağlanma bölgeleri bulunur (Ishimitsu vd., 1994). Ek olarak ilk intron transkripsiyonel regülasyonu sağlayan çeşitli elementleri içerir. Bu yolla AdM üretimi büyük ölçüde düzenlenir (Cheyuo vd., 2012). Obez + resveratrol grubu dışında AdM enjekte edilen sıçanlarda *AdM* gen ifadesinin olmadığı görülmüştür. Bir geri besleme mekanizmasıyla ortamda bulunan AdM'in kendi gen ifadesini düzenleyerek baskıladığı ileri sürülebilir. Kontrol grubu %100 alındığında kontrol obez grubunda ifade %217 değeriyle artarken obez + resveratrol grubu %77 değeriyle azalmıştır. Obezite, adipoz dokuda AdM ifadesinin artmasına neden olur. Yüksek yağ diyetiyle beslenen sıçanların yağ dokusunda *AdM* ifadesi, normal diyetle beslenenlere göre daha fazladır (Fukai vd., 2004). Deney sonuçları yüksek yağ diyetiyle beslenen kontrol obez grubunda *AdM* ifadesinin arttığı göstererek literatürü desteklemektedir. Obez + resveratrol grubu *AdM* ifadesinin kontrol obez grubuna göre azalmış olması resveratrolün vücut depo dokularındaki adipositler ve kemik iliği üzerinde obezite karşıtı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Resveratrol adipogenezi ve olgunlaşan preadipositlerin yaşayabilirliğini azaltır. Ayrıca olgun adipositlerde lipolizi artırır, lipogenezi azaltır (Rayalam vd., 2008). Resveratrolün diyetle alımının yüksek yağ diyetiyle beslenen farelerde obeziteye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Lagouge vd., 2006). Deney sonuçları resveratrolün bu etkisini desteklemektedir.

Kontrol grubuyla diğer gruplar karşılaştırıldığında obez + AdM ve obez + AdM + resveratrol grupları arasında AdM protein miktarlarında fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Obez + AdM grubunda AdM protein miktarı %448, obez + AdM + resveratrol grubunda ise %1042 değeriyle artmıştır. AdM enjekte edilen gruplarda AdM protein seviyelerinin arttığı görülmüştür. Buna ilave olarak obez bireylerin plazmalarında AdM konsantrasyonu artmakta ve bu artışın kaynağının adipoz doku olduğu ileri sürülmektedir (Kato vd., 2002). Obez ve AdM enjekte edilen gruplarda AdM protein miktarının daha fazla artmasının nedeni AdM'in obeziteye karşı

koruyucu etkisi sonucu olabilir. Vücut ağırlığı artıkça *AdM* ifadesi de artış gösterir (Nambu vd., 2005).

Kontrol + AdM, kontrol + resveratrol, kontrol + AdM + resveratrol, obez + AdM ve obez + AdM + resveratrol gruplarında *AdM* ifadesi görülmediğinden bu gruplarla kontrol, kontrol obez ve obez + resveratrol grupları arasında fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). AdM protein ifadesi bakımından ise kontrol + AdM grubu ile obez + AdM ve obez + AdM + resveratrol grupları arasında fark görülmüştür ( $p<0.05$ ). Kontrol + AdM grubu değeri %100 alındığında obez + AdM grubu %248, obez + AdM + resveratrol grubu ise %576 değerlerini almaktadır. Bu değerler obezitede AdM miktarının artışını desteklemektedir. Obezitede AdM ve resveratrolün beraber uygulanmasının AdM miktarında yaklaşık 6 kata kadar artışa neden olması, resveratrolün de AdM miktarındaki artışa katkıda bulunabileceğini akla getirmektedir. Oysa resveratrol vazoaktif peptidlerin sentezini azaltır (Bertelli, 2007). Resveratrolün AdM üzerine nasıl bir etki gösterdiğine dair literatürde yeterli bilgi yoktur. Resveratrol AdM gibi yüksek yağ diyetinin meydana getirdiği insülin direnci, hiperglisemi ve dislipidemi gibi zararlı fizyolojik etkilere karşı koruyucudur. Resveratrol yüksek yağ diyetinin neden olduğu 153 ifade değişikliğinden 144'ünü geriletir (Baur vd., 2006). Bu iki molekül ortak etkileri nedeniyle AdM protein miktarının artışına katkıda bulunmuş olabilirler. Resveratrol MAPK'lar, NF- $\kappa$ B ve MMP'leri içeren UV aracılı fotoyaşlanma ile ilişkili hücrel sinyal mekanizmaları üzerine etki eder (Baxter, 2008). *AdM* geninin promotorunda ise NF- $\kappa$ B bölgeleri de bulunmuştur (Ishimitsu vd., 1994). Ayrıca AdM dolaylı etkisini MAPK'lar aracılığıyla gösterir (Samson, 1999). Resveratrol AdM miktarlarını bu ortak moleküller aracılığıyla düzenleyebilir.

Kontrol + resveratrol grubu ile AdM protein miktarı bakımından kontrol + AdM + resveratrol, obez + AdM ve obez + AdM + resveratrol grupları arasında fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kontrol + AdM + resveratrol grubu %262, obez + AdM grubu %553, obez + AdM + resveratrol grubu %1286 değeriyle artış gözlenmiştir. Bu değerlere göre de AdM miktarının obezitede arttığı ve resveratrolün bu artışa katkıda bulunduğu görülmüştür.

Kontrol + AdM + resveratrol grubu AdM protein miktarı bakımından diğer gruplarla karşılaştırıldığında kontrol + resveratrol, obez + AdM ve obez + AdM + resveratrol grupları arasında fark vardır ( $p<0.05$ ). Kontrol + resveratrol grubu %38 değeriyle azalma, obez + AdM grubu %211, obez + AdM + resveratrol grubu %492

değerleriyle artış göstermiştir. Kontrol + resveratrol grubunda görülen azalma kontrol + AdM + resveratrol grubuna enjekte edilen AdM nedeniyle olabilir.

Kontrol obez grubu *AdM* gen ifadesi bakımından diğer gruplarla karşılaştırıldığında *AdM* gen ifadesi bulunan bütün gruplarda farklılık görülmüştür ( $p<0.05$ ). *AdM* ifadesinin kontrol grubunda %46 ve obez + resveratrol grubunda %36 değerleriyle azaldığı görülmüştür. Bu değerlere göre obez + resveratrol grubunda resveratrolün *AdM* ifadesinde artışa neden olduğu görülmektedir. Fakat bu artış kontrol obez grubundaki kadar yüksek değildir. Bunun nedeni resveratrolün vazoaktif peptidlerin sentezini azaltma etkisinden kaynaklanabilir. Buradan yola çıkarak resveratrolün *AdM* geninin regülasyonunda rol oynadığı ileri sürülebilir. Bu regülasyon normal yemle beslenen sıçanlarda negatifken yüksek yağ diyetiyle beslenen sıçanlarda pozitif yönde olabilir. Çünkü farelerde resveratrolün ömür uzunluğuna olan etkisi diyet içeriğine bağlıdır. Resveratrol yüksek yağ diyetiyle beslenen sıçanlarda ömrün uzamasını sağlamıştır (Baur vd., 2006). Fakat normal yemle beslenen farelerde aynı etki görülmemiştir (Barger vd., 2008). Protein miktarına bakıldığında obez + AdM ve obez + AdM + resveratrol gruplarıyla farklılık görülmüştür ( $p<0.05$ ). Obez + AdM grubunda %267, obez + AdM + resveratrol grubunda %620 değerleriyle artış görülmüştür.

Obez + AdM grubu AdM protein miktarı diğer bütün gruplarla farklılık göstermiştir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %22, kontrol + AdM grubunda %4, kontrol + resveratrol grubunda %12, kontrol obez grubunda %38, obez + resveratrol grubunda %32 değerleriyle azalma ve obez + AdM + resveratrol grubunda %233 ile artış görülmüştür.

Obez + resveratrol grubuyla obez + AdM ve obez + AdM + resveratrol grupları arasında AdM protein miktarları açısından fark görülmüştür ( $p<0.05$ ). Obez + AdM grubunda %318 ve obez + AdM + resveratrol grubunda %739 değerleriyle artış olmuştur.

Obez + AdM + resveratrol grubuyla diğer bütün gruplar arasında AdM protein miktarında fark vardır ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %10, kontrol + AdM grubunda %17, kontrol + resveratrol grubunda %0.8, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %20, kontrol obez grubunda %16, obez + AdM grubunda %43 ve son olarak obez + resveratrol grubunda %14 değerleriyle azalma vardır.

## 5.2 KYD AdM Sonuçları

Kontrol ve obez grupların AdM ve resveratrol uygulamalarına farklı yanıtlar vermeleri gibi KYD'nin de BYD'den farklı yanıtlar verdiği görülmüştür. Yapı ve işlev bakımından farklı olan bu iki doku, uygulamalara da farklı yanıtlar verdiği görülmüştür. AdM ve resveratrolün ayrı ayrı ve beraber uygulanması, KYD ve BYD dokularında farklı yolaqları etkilediğini akla getirmektedir. Bu yolaqların aydınlatılması bu iki dokunun mekanizmalarının aydınlatılmasını sağlayacaktır.

KYD'de hiçbir grupta *AdM* ifadesi görülmemiştir. Kontrol grubunda AdM protein miktarına bakıldığında diğer bütün gruplar arasında fark vardır ( $p<0.05$ ). Kontrol + AdM grubunda %133, obez + AdM + resveratrol grubunda ise %174 değerleri ile artış görülürken, kontrol + resveratrol grubunda %76, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %59, kontrol obez grubunda %72, obez + AdM grubunda %48 ve obez + resveratrol grubunda %75 ile azalma görülmüştür. AdM uygulaması sonucu kontrol + AdM ve obez + AdM + resveratrol gruplarında AdM protein miktarlarının arttığı görülmektedir. Obez + AdM grubunda AdM miktarındaki düşüş şaşırtıcıdır. Yağ dokuları vücuttaki yerleşim yerlerine göre farklı işlevler görürler. Örneğin omental yağ dokusu obeziteyle ilişkili hastalıklarda ve metabolik sendromda önemli bir rol oynar. (Paulmyer-Lacroix vd., 2006). Bej hücre öncülleri, çeşitli çevresel uyarılar sonucu, genellikle subkutan BYD'den farklılaşırlar (Lee vd., 2012). KYD ise soğuk ve aşırı beslenmeye karşı korunmada kimyasal enerjiyi ısı enerjisine dönüştüren oldukça özelleşmiş bir dokudur (Kajimura ve Saito, 2014). KYD kemirgenlerde öncelikle interskapular bölge ve aksillada, daha az miktarlarda timusun yanında, toraks ve abdomenin dorsal orta hattında bulunur (Frühbeck vd., 2009). Bu dokuların protein ifadeleri ve miktarları da farklılık göstermektedir. Dört haftalık AdM ve resveratrol uygulaması sırasında *AdM* ifade edilip gerekli metabolik ve fizyolojik değişiklikleri yaptıktan sonra ifadesi baskılanmış, burada gen ifadesi ve protein miktarı saptanamamış olabilir. Önceki çalışmamızda 4 gün süreyle bu deneyle aynı doz (2.5 nmol/kg) AdM uygulaması sonucunda obez ve kalori kısıtlaması yapılan gruplarda AdM protein miktarının arttığı görülmüştür (Yurekli ve Culum, 2016).

Kontrol + AdM grubuyla diğer bütün gruplar arasında AdM protein miktarlarında fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %75, kontrol + resveratrol grubunda %57, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %44, kontrol obez



grubunda %54, obez + AdM grubunda %36, obez + resveratrol grubunda %56 değerleriyle azalma, obez + AdM + resveratrol grubunda ise %131 değerleriyle artış görülmüştür. AdM uygulaması kontrol + AdM grubunda AdM miktarını artırmıştır. KYD'de AdM protein seviyeleri BYD obez gruplardaki kadar yüksek miktarlarda değildir. AdM adipoz dokuda bol miktarda ifade edilir. AdM'nin adipoz dokuda ifade edildiğini kanıtlayan çalışmalar, AdM'nin adipokin ailesini bir üyesi olduğunu göstermektedir (Li vd., 2007). Deney sonuçları AdM miktarı açısından BYD'nin obeziteye karşı KYD'den daha duyarlı olduğunu göstermektedir. AdM KYD'de farklı etkilere sahip olabilir.

Kontrol + resveratrol grubu ile kontrol obez ve obez + resveratrol grupları ( $p>0.05$ ) dışındaki diğer bütün gruplar arasında AdM miktarı arasında farklılık görülmüştür ( $p<0.05$ ). Kontrol + resveratrol grubu değeri %100 alındığında kontrol grubunda %132, kontrol + AdM grubunda %175, obez + AdM + resveratrol grubunda %229 ile artış ve kontrol + AdM + resveratrol grubunda %77, obez + AdM grubunda %59 değerleriyle azalma görülmüştür. Bu değerler KYD'de AdM üzerine resveratrolün BYD'den farklı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. BYD'de olduğu gibi KYD'de de AdM ve resveratrolün beraber uygulanması obez sıçanlarda AdM miktarını artırmıştır. Resveratrol BYD'de olduğu gibi KYD'de AdM'in ifadesini ve protein miktarını düzenleyebilir. İki doku arasındaki AdM miktarındaki farklılık bu dokuların obeziteye karşı duyarlılıklarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir. Ek olarak reseptörüne bağlı bulunan AdM miktarının saptanmaması düşük AdM miktarlarını açıklayabilir.

Kontrol + AdM + resveratrol grubu ile bütün grupların AdM protein seviyeleri arasında fark vardır ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %169, kontrol + AdM grubunda %225, kontrol + resveratrol grubunda %128, kontrol obez grubunda %122, obez + resveratrol grubunda %127, obez + AdM + resveratrol grubunda %295 değeriyle artış görülürken obez + AdM grubunda %76 ile azalma görülmüştür. Burada resveratrolün obez ve kontrol gruplarında farklı etkilere sahip olduğu görülmektedir.

Kontrol obez grubuyla AdM protein miktarı açısından kontrol + resveratrol ve obez + resveratrol grupları arasında fark yoktur ( $p>0.05$ ). Fakat diğer gruplar ile fark vardır ( $p<0.05$ ). Normal kontrol grubunda %139, normal + AdM grubunda %185 ve obez + AdM + resveratrol grubunda %242 değeriyle artış, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %82, obez + AdM grubunda %67 ile azalma vardır.

AdM protein miktarları bakımından obez + AdM grubuyla diğer gruplar arasında fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %208, kontrol + AdM grubunda %277, kontrol + resveratrol grubunda %158, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %123, kontrol obez grubunda %150, obez + resveratrol grubunda %156, obez + AdM + resveratrol grubunda %363 değeriyle artış bulunmuştur. BYD'de obez gruba AdM uygulaması sonucu AdM miktarı artarken KYD'de düşüşe neden olmuştur. Bu BYD ve KYD'nin AdM uygulamasına farklı yanıtlar verdiğini göstermektedir.

Obez + resveratrol grubu AdM miktarı kontrol + resveratrol ve kontrol obez grupları ( $p>0.05$ ) dışındaki grupların hepsinden farklıdır ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %133, kontrol + AdM grubunda %177, obez + AdM + resveratrol grubunda %232 değerleriyle artış ve kontrol + AdM + resveratrol grubunda %79, obez + AdM grubunda %60 ile azalma görülmüştür. Resveratrolün obez grupta AdM miktarındaki düşüşe neden olması vazoaaktif peptidlerin sentezini azaltmasından kaynaklanabilir (Bertelli, 2007).

Obez + AdM + resveratrol grubu AdM protein değerleri diğer bütün gruplardan farklıdır ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %57, kontrol + AdM grubunda %77, kontrol + resveratrol grubunda %44, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %34, kontrol obez grubunda %41, obez + AdM grubunda %28, obez + resveratrol grubunda %43 değerleriyle azalma vardır. Obez + AdM + resveratrol grubunda en yüksek AdM protein miktarı saptanmıştır. AdM protein miktarı ve ifadesiyle ilgili daha kesin veriler elde etmek için *preproAdM* ifadesi, CRLR, RAMP1 RAMP2, AdM reseptör bileşenleri gen ifadesi ve protein miktarlarına bakılmalıdır. Bu veriler AdM'in ifadesi, sentezi ve reseptöre bağlanma durumları hakkında daha geniş bilgiler verecektir.

### 5.3 BYD SIRT1 Sonuçları

*SIRT1* gen ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kontrol + AdM + resveratrol grubu, obez + AdM grubu ve obez + AdM + resveratrol grubuyla aynı ( $p>0.05$ ), diğer gruplarla farklıdır ( $p<0.05$ ). Kontrol grubuna göre, kontrol + AdM grubunda ifade %44 değeriyle azalmış ve kontrol + resveratrol grubunda %115, kontrol obez grubunda %137, obez + resveratrol grubunda %167 değeriyle artmıştır. Bu değerlere göre AdM uygulamasının *SIRT1* gen ifadesi üzerine negatif yönde etki ettiği görülmektedir. Kalori kısıtlamasının sirtuin genlerini aktive ederek ömür

uzunluğunu artırdığı bilinmektedir. Resveratrol kalori kısıtlamasını taklit eden bilinen tek polifenoldür (Baxter, 2008). Bu deneyde de resveratrol uygulamasının *SIRT1* gen ifadesini artırdığı görülmüştür. Resveratrol etkisini yüksek yağ diyetiyle beslenen sıçanlarda göstermektedir (Baur vd., 2006). Bu veri obez + resveratrol grubundaki yüksek *SIRT1* ifadesinin nedenini açıklamaktadır. SIRT1 protein miktarlarına bakıldığında ise kontrol grubuyla diğer gruplar arasında farklılık görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Kontrol + AdM grubunda %221, kontrol + resveratrol grubunda %165, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %212, kontrol obez grubunda %162, obez + AdM grubunda %350, obez + AdM + resveratrol grubunda %346 değerleri göz önüne alındığında artış olduğu görülmüştür. AdM'nin *SIRT1* gen ifadesi üzerine negatif etkisi olduğu görülürken SIRT1 protein miktarı üzerine pozitif etkisi olduğu görülmüştür. Bunun nedeni bir aylık uygulamalar sonucunda *SIRT1* gen ifadesindeki artışın saptanamaması olabilir, ya da AdM'nin, örneğin mRNA ömrünü ve stabilitesini artırma gibi başka düzenlemelerle SIRT1 protein miktarını artırması olabilir. Sirtuinler kofaktör olarak  $NAD^+$ 'ya gereksinim duyarlar (Michishita vd., 2005). AdM  $NAD^+$  aracılığıyla SIRT1'e etki edebilir.

Kontrol + AdM grubu *SIRT1* gen ifadesiyle diğer bütün gruplar arasında farklılık bulunmaktadır ( $p < 0.05$ ). Kontrol grubunda %227, kontrol + resveratrol grubunda %261, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %197, kontrol obez grubunda %311, obez + AdM grubunda %239, obez + resveratrol grubunda %380, obez + AdM + resveratrol grubunda %227 değeriyle artmıştır. Kontrol + AdM SIRT1 protein seviyelerine bakıldığında ise kontrol + AdM + resveratrol grubu ve obez + resveratrol grubu ile arasında fark yoktur ( $p > 0.05$ ), fakat diğer gruplarla fark vardır ( $p < 0.05$ ). Kontrol grubunda %45, kontrol + resveratrol grubunda %74, kontrol obez grubunda %73 değerleriyle azalma, obez + AdM grubunda %158, obez + resveratrol grubunda %110, obez + AdM + resveratrol grubunda %157 ile artış bulunmuştur. Bu değerlere bakıldığında en düşük gen ifadesi kontrol + AdM grubundadır. Fakat protein seviyelerine bakıldığında AdM'in SIRT1 miktarını artırdığı görülmektedir. AdM birçok fonksiyona sahip, otokrin ve parakrin düzenleyici bir proteindir. Güçlü hipotensif aktiviteye sahiptir, ayrıca vazorelaksasyon, diüretik etki ve aldosteron salgılanmasını engellenmesi gibi birçok biyolojik aktivitesi bulunmaktadır. Çeşitli hücre soylarında proliferasyon, farklılaşma ve göçü düzenlediği gösterilmiştir (Hinson vd., 2000; Kitamura vd., 1993). AdM'in SIRT1 protein miktarını hangi mekanizmalarla artırdığını anlamak için daha detaylı

çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu çalışmalar çok geniş işlevlere sahip olan AdM'in yeni özelliklerinin ortaya çıkarılmasını sağlayabilir.

Kontrol + resveratrol grubunda *SIRT1* gen ifadesi diğer gruplarla farklılık göstermiştir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %87, kontrol + AdM grubunda %38, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %76, obez + AdM grubunda %91, obez + AdM + resveratrol grubunda %87 değeriyle azalma ve kontrol obez grubunda %119, obez + resveratrol grubunda %145 değeriyle artış bulunmuştur. Protein miktarları karşılaştırıldığında kontrol obez grubu ( $p>0.05$ ) dışındaki gruplar arasında fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %61 değeriyle azalma görülürken kontrol +AdM grubunda %137, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %129, obez + AdM grubunda %213, obez + AdM + resveratrol grubunda %211 değerleriyle artış görülmüştür. *SIRT1* insan adipoz dokusunda metabolik olarak düzenlenir (Pedersen vd., 2008) ve *SIRT1* aktivitesi yağ dokusunu harekete geçirir. *SIRT1* aktivatörleri yüksek yağ diyetiyle beslenen farede obezite ve insülin direncine karşı koruyucudur (Clark vd., 2012). *SIRT1* geninde bulunan SNP'lerle obezite arasında bir ilişki bulunur (Peeters vd., 2008). Obez ve zayıf insanların subkutan yağ dokularındaki *SIRT1* mRNA ifadeleri karşılaştırıldığında, zayıf insanlarda *SIRT1* ifadesinin iki kat daha fazla olduğu görülür (Pedersen vd., 2008). Bu veriler *SIRT1*'deki bazı varyantların obeziteye neden olduğunu göstermektedir. Bu varyantlar enerji metabolizmasının çevresel değişkenlere karşı uyum sağlamasını engelleyerek obeziteye neden olabilir. Obez bireylerde *SIRT1* ifadesinin düzenlenmesi obeziteyi ve neden olduğu metabolik bozuklukları geriletebilir.

*SIRT1* gen ifadesi açısından kontrol + AdM + resveratrol grubuyla kontrol ve obez + AdM + resveratrol grupları arasında fark yoktur ( $p>0.05$ ), diğer gruplar arasında vardır ( $p<0.05$ ). Obez ve kontrol gruplarda AdM ve resveratrolün beraber uygulanması *SIRT1* gen ifadesinin kontrol grubuyla aynı değerlerde kalmasını sağlamıştır. Obezite birçok genin işe karıştığı multifaktöriyel bir hastalıktır. AdM ve resveratrol *SIRT1*'de olduğu gibi obezitede rolü olan birçok genin normal ifade seviyelerinde kalmasını sağlamış olabilir. Kontrol + AdM grubunda %51 değeriyle azalma ve kontrol + resveratrol grubunda %132, kontrol obez grubunda %158, obez + AdM grubunda %121, obez + resveratrol grubunda %192 değeriyle artış bulunmuştur. Protein seviyeleri açısından bütün gruplar arasında fark vardır ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %47, kontrol + resveratrol grubunda %77, kontrol obez grubunda %76 değeriyle azalma ve kontrol + AdM grubunda %104, obez + AdM

grubunda %165, obez + resveratrol grubunda %114, obez + AdM + resveratrol grubunda %163 değeriyle artış bulunmuştur.

Gen ifadesi açısından kontrol obez grubuyla diğer gruplar arasında fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %73, kontrol + AdM grubunda %32, kontrol + resveratrol grubunda %84, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %64, obez + AdM grubunda %77, obez + AdM + resveratrol grubunda %73 azalma ve obez + resveratrol grubunda %122 değerleriyle artış görülmüştür. Genel olarak yüksek yağ diyeti *SIRT1* kopyalanmasını engellemektedir. Fakat deneyimizde kontrol obez grubunda ifadenin arttığı görülmektedir. *SIRT1* enerjiye duyarlı bir moleküldür. Hücrenin enerji durumuna göre transkripsiyonel düzenlemeler yapar (Clark vd., 2012). Fazla *SIRT1* ifade eden fareler daha uzun ömürlüdür. Ayrıca düşük kolesterol, kan şekeri, insülin seviyeleri görülür. Ek olarak nöronlarında mitokondri sayısını artırır (Vinciguerra vd., 2010). Kontrol obez grubunda *SIRT1* gen ifadesinin artış göstermesi, *SIRT1*'in obezitede koruyucu olarak görev yaptığını ve enerji mekanizmasını obeziteye göre yeniden düzenlediğini akla getirmektedir. *SIRT1* miktarının artışıyla *PGC1 $\alpha$*  deasetile edildiğinde glukoneogenez ve yağ asiti beta oksidasyonu artar, glikoliz azalır (Rodgers vd., 2005). Kaslarda ise mitokondriyal yağ asiti oksidasyon genleri aktive olur (Gerhart-Hines vd., 2007). *SIRT1* tarafından deasetile olan *PPAR $\gamma$*  metabolizmayı lipoliz lehine çevirir ve serbest yağ asiti mobilizasyonunu artırır (Picard vd., 2004). *SIRT1* protein ifadesi göz önüne alındığında kontrol + resveratrol grubu ( $p>0.05$ ) dışındaki diğer bütün gruplar arasında fark görülmüştür ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %62 azalma görülürken, kontrol + AdM grubunda %136, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %131, obez + AdM grubunda %217, obez + resveratrol grubunda %149, obez + AdM + resveratrol grubunda %214 artış vardır.

Obez + AdM grubunda *SIRT1* gen ifadesi kontrol ve obez + AdM + resveratrol grupları arasında değişmemiştir ( $p>0.05$ ), fakat diğer gruplar arasında fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kontrol + AdM grubunda %42, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %83 değerleriyle azalma görülürken kontrol + resveratrol grubunda %110, kontrol obez grubunda %131, obez + resveratrol grubunda ise %159 değerleriyle artış vardır. Obez + AdM grubuyla *SIRT1* protein seviyeleri açısından karşılaştırıldığında obez + AdM + resveratrol grubuyla fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ), diğer gruplarla fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Kontrol grubunda %29, kontrol + AdM grubunda %63, kontrol + resveratrol grubunda %47, kontrol + AdM + resveratrol

grubunda %61, kontrol obez grubunda %46, obez + resveratrol grubunda %69 değerleriyle azalma görülmüştür.

Obez + resveratrol grubunda *SIRT1* gen ifadesi açısından diğer bütün gruplarla fark vardır ( $p < 0.05$ ). Kontrol grubunda %60, kontrol + AdM grubunda %26, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %52, kontrol obez grubunda %82, obez + AdM grubunda %63, obez + AdM + resveratrol grubunda %60 değerleriyle düşüş görülmüştür. Protein miktarlarında ise kontrol + AdM grubu ( $p > 0.05$ ) dışındaki bütün gruplarla fark vardır ( $p < 0.05$ ). Kontrol grubu obez + resveratrol grubunun %41'i, kontrol + AdM grubu %91'i, kontrol + AdM + resveratrol grubu %88'i, kontrol obez grubu %67'si, obez + AdM + resveratrol grubu %143'ü kadardır.

Obez + AdM + resveratrol grubunda *SIRT1* gen ifadesi yönünden kontrol + AdM, kontrol + resveratrol, kontrol obez ve obez + resveratrol grupları arasında farklılık varken ( $p < 0.05$ ) diğer gruplar arasında bir fark yoktur ( $p > 0.05$ ). Obez + AdM + resveratrol grubunun %100 olduğu durumda kontrol + AdM grubu %44, kontrol + resveratrol grubu %114, kontrol obez grubu %137, obez + resveratrol grubu %167 değerini almaktadır. Protein değeri açısından ise sadece obez + AdM grubunun protein miktarı farklı değildir ( $p > 0.05$ ). Kontrol grubu %29, kontrol + AdM grubu %64, kontrol + resveratrol grubu %48, kontrol + AdM + resveratrol grubu %61, kontrol obez grubu %47, obez + resveratrol grubu %70 değerini almaktadır.

#### **5.4 KYD SIRT1 Sonuçları**

KYD'de *SIRT1* gen ifadesi açısından kontrol grubuyla kontrol + AdM ve obez + AdM + resveratrol grupları ( $p > 0.05$ ) dışında bütün gruplarla farklılık vardır ( $p < 0.05$ ). Kontrol + resveratrol grubu %159, kontrol + AdM + resveratrol grubu %242, kontrol obez grubu %160, obez + AdM grubu %141, obez + resveratrol grubu %203 değerlerini almaktadır. Bu değerlerin ve cevapların BYD'den farklı oldukları görülmektedir. Bu farklılık AdM'in bu iki dokuda farklı mekanizmalarla etki ettiğini akla getirmektedir. KYD kontrol + AdM grubunda AdM gen ifadesini değiştirmemiştir. Fakat resveratrolle beraber uygulanması ile ifadede artış sağlanmıştır. Ayrıca KYD mitokondrilerinin iç zarında bulunan UCP1 sayesinde yağ asitlerinin oksidasyonu ile ATP yerine ısı meydana gelir (Frühbeck vd., 2009; Krauss vd., 2005; Rosen ve Spiegelman, 2006). Sonuç olarak KYD'nin enerji metabolizmasındaki görevi BYD'den farklıdır. Bu nedenle enerji değişimlerine

duyarlı olan SIRT1'in KYD'deki rolü daha farklı olacaktır. Protein değerleri karşılaştırıldığında kontrol + AdM ve kontrol + resveratrol gruplarıyla kontrol grubu aynı ( $p>0.05$ ), diğer gruplar farklıdır ( $p<0.05$ ). Kontrol + AdM + resveratrol grubu %69, kontrol obez grubu %157, obez + AdM grubu %176, obez + resveratrol grubu %277 ve obez + AdM + resveratrol grubu %145 değerini almaktadır. SIRT1 miktarı obez ve kontrol gruplarda farklı değerlerdedir. Bu değer obez gruplarda daha fazladır. Kontrol + AdM + resveratrol grubunda SIRT1 miktarındaki düşüş AdM'in de, resveratrolün AdM üzerine olduğu gibi, resveratrol üzerinde negatif bir etkiye sahip olabileceğini akla getirmektedir. Resveratrol kontrol gruplarında SIRT1 miktarına etki etmezken yüksek yağ diyetiyle beslenen obez grupta SIRT1 miktarının artışı sağlamıştır. Fakat gen ifadesi açısından resveratrol hem obez hem de kontrol grubunda *SIRT1* gen ifadesini arttırmıştır.

Kontrol +AdM grubunda *SIRT1* gen ifadesi kontrol ve obez + AdM + resveratrol gruplarıyla aynı ( $p>0.05$ ), diğer gruplarla farklıdır ( $p<0.05$ ). Bu farkın değeri kontrol + resveratrol grubunda %150, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %228, kontrol obez grubunda %151, obez + AdM grubunda %133, obez + resveratrol grubunda %192'dir. Protein seviyeleri açısından kontrol ve kontrol + resveratrol grupları ( $p>0.05$ ) dışındaki gruplar arasında fark vardır ( $p<0.05$ ). Kontrol + AdM grubuna göre kontrol + AdM + resveratrol grubu %63, kontrol obez grubu %144, obez + AdM grubu %162, obez + resveratrol grubu %254, obez + AdM + resveratrol grubu %133 değerini almaktadır.

*SIRT1* gen ifadesi açısından kontrol + resveratrol grubu kontrol obez ve obez + AdM grupları ( $p>0.05$ ) dışındaki gruplardan farklıdır ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu %63, kontrol + AdM grubu %67, kontrol + AdM + resveratrol grubu %152, obez + resveratrol grubu %128, obez + AdM + resveratrol grubu %78 değerini alır. Protein seviyelerine bakıldığında kontrol ve kontrol + AdM ( $p>0.05$ ) dışındaki gruplarda farklılık görülmektedir ( $p<0.05$ ). Kontrol + AdM + resveratrol grubunda değer %75, kontrol obez grubunda %171, obez + AdM grubunda %191, obez + resveratrol grubunda %301, obez + AdM + resveratrol grubunda %158 olmaktadır.

Kontrol + AdM + resveratrol grubunda *SIRT1* gen ifadesi bütün gruplarla farklılık göstermektedir ( $p<0.05$ ). Bu gruba göre kontrol grubu %41, kontrol + AdM grubu %44, kontrol + resveratrol grubu %66, kontrol obez grubu %66, obez + AdM grubu %58, obez + resveratrol grubu %84, obez + AdM + resveratrol grubu %50 değerini almaktadır. SIRT1 protein miktarları açısından da bütün gruplarla fark

görülmektedir ( $p<0.05$ ). Bu farklılık kontrol grubu %145, kontrol + AdM grubu %158, kontrol + resveratrol grubu %133, kontrol obez grubu %228, obez + AdM grubu %255, obez + resveratrol grubu %401, obez + AdM + resveratrol grubu %210'dur. Kontrol + AdM + resveratrol grubunda gen ifadesi en yüksek seviyedeysen protein miktarı diğer gruplar arasında en düşük seviyededir. Bu durum akla şu soruları getirir: *SIRT1* mRNA'sı kopyalandıktan sonra nükleolusta depolanır mı, *SIRT1* mRNA'sının transle olması için bir uyarıcı moleküle mi ihtiyacı var, AdM ve resveratrol beraber uygulandığında bu uyarıcı molekülü engelliyor mu veya sentez süresini nasıl etkiler, bu meydana gelen durum yüksek yağ diyetinde farklı şekilde mi gerçekleşir... *SIRT1* aracılı deasetilaz reaksiyonları çoğunlukla nükleerdir. Birçok dokudaki çoğu proteini hedefleyerek bu proteinlerin sonraki biyolojik aktivitelerini etkilerler (Kelly, 2010b). Literatürde AdM ve resveratrolün beraber uygulanmasının *SIRT1* üzerine etkisiyle ilgili bir çalışma yoktur. Bu soruların aydınlanması için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kontrol obez grubu *SIRT1* gen ifadesi açısından kontrol + resveratrol ve obez + AdM grupları ( $p>0.05$ ) dışında bütün gruplarla farklılık göstermektedir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu %63, kontrol + AdM grubu %66, kontrol + AdM + resveratrol grubu %151, obez + resveratrol grubu %127, obez + AdM + resveratrol grubu %76 değerini almaktadır. Protein miktarları açısından obez + AdM + resveratrol grubu ( $p>0.05$ ) dışındaki diğer gruplarla farklılık göstermektedir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu %64, kontrol + AdM grubu %69, kontrol + resveratrol grubu %59, kontrol + AdM + resveratrol grubu %44, obez + AdM grubu %112, obez + AdM + resveratrol grubu %92 değerini almaktadır.

Gen ifadesi yönünden obez + AdM grubu ile kontrol +resveratrol, kontrol obez ve obez + AdM + resveratrol grupları arasında farklılık yoktur ( $p>0.05$ ). Kontrol grubu obez + AdM grubuna göre %71, kontrol + AdM grubu %75, obez + AdM + resveratrol grubu %87 değerini alır. Protein miktarları açısından bütün gruplarla farklılık görülmüştür ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu %57, kontrol + AdM grubu %62, kontrol + AdM + resveratrol grubu %40, kontrol obez grubu %89, obez + resveratrol grubu %157, obez + AdM + resveratrol grubu %82 değerini almaktadır.

*SIRT1* gen ifadesi yönünden obez + resveratrol grubu bütün gruplarla farklılık gösterir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu %49, kontrol + AdM grubu %52, kontrol + AdM + resveratrol grubu %119, kontrol obez grubu %79, obez + AdM grubu %70, obez + AdM + resveratrol grubu %60 değerlerini almaktadır. Obez + resveratrol grubunda



SIRT1 protein miktarı diğer gruplarla farklılık göstermiştir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu %36, kontrol + AdM grubu %39, kontrol + AdM + resveratrol grubu %25, kontrol obez grubu %57, obez + AdM grubu %64, obez + AdM + resveratrol grubu %52 değerlerini almaktadır.

Obez + AdM + resveratrol grubu *SIRT1* gen ifadesi kontrol + resveratrol, kontrol + AdM + resveratrol, kontrol obez ve obez + resveratrol gruplarından farklıdır ( $p<0.05$ ). Kontrol + resveratrol grubunda bu değer %130, kontrol + AdM + resveratrol grubunda %198, kontrol obez grubunda %131, obez + resveratrol grubu %166'dır. Protein miktarı bakımından kontrol obez grubu ( $p>0.05$ ) dışındaki gruplarda farklılık vardır ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu %69, kontrol + AdM grubu %75, kontrol + resveratrol grubu %64, kontrol + AdM + resveratrol grubu %48, obez + AdM grubu %121, obez + resveratrol grubu %191 değerini almaktadır. Ek olarak SIRT1'in UCP1 sentezi ve gen ifadesine bakılmalıdır. Ayrıca KYD ve BYD'de SIRT1'in hangi proteinler üzerine etki ettiği, AdM ve resveratrolün SIRT1'in etki ettiği proteinlerde ne gibi değişikliklere yol açtığı araştırılmalıdır.

## 5.5 BYD VEGF-A Sonuçları

BYD'de *VEGF-A* ifadesi kontrol, kontrol obez, obez + resveratrol ve obez + AdM + resveratrol gruplarında ve *VEGF-A* transkript varyant 1, 2 ve 3 olarak görülmüştür.

*VEGF-A* geninden alternatif kesip biçimle farklı özellik ve fonksiyonlarda *VEGF-A*<sub>121</sub>, *VEGF-A*<sub>145</sub>, *VEGF-A*<sub>148</sub>, *VEGF-A*<sub>165</sub>, *VEGF-A*<sub>183</sub>, *VEGF-A*<sub>189</sub> ve *VEGF-A*<sub>206</sub> olmak üzere en az 7 izoform meydana gelir (Distler vd., 2003). *VEGF-A*<sub>189</sub> ve *VEGF-A*<sub>206</sub>'nın heparin sülfata affiniteleri vardır. Çoğunlukla hücre yüzeyi veya ekstraselüler matriksde bulunurlar. *VEGF-A*<sub>121</sub> ve kısmen *VEGF-A*<sub>165</sub> ise ekstraselüler sıvılarda bağlanmadan kalırlar (Houck vd, 1992). *VEGF-A*<sub>121</sub> en yaygın, *VEGF-A*<sub>165</sub> en etkili ve *VEGF-A*<sub>189</sub> ise en bol bulunan izoformlardır (Duarte vd., 2011). Sıçan *VEGF*'leri (*VEGF-A*<sub>120</sub>, *VEGF-A*<sub>144</sub>, *VEGF-A*<sub>164</sub> ve *VEGF-A*<sub>188</sub>) insan *VEGF*'leriyle aminoasit dizisi olarak %90 benzerlik gösterirler (Ishii vd., 2002).

*VEGF-A* transkript varyant 1 (*VEGF-A*<sub>188</sub> mRNA) ifadesi kontrol ve kontrol obez gruplarında görülmüştür. Bu iki grup arasında fark vardır ve diğer gruplarda ifade olmamasından dolayı diğer gruplar arasında da fark vardır ( $p<0.05$ ). Kontrol grubuna göre kontrol obez grubu %173 değerini alırken kontrol obez grubuna göre

kontrol grubu %58 değerini almaktadır. BYD büyük plastisiteye sahiptir, iç uyarılara ve enerji dengesindeki değişikliklere adapte olur (Frühbeck vd., 2009). Yetişkin adipoz doku olasılıkla vücuttaki en plastik dokudur. Yetişkin hayatı boyunca genişler ve küçülür. Büyüyen adipoz dokuda anjiogenik damarlar, sayısız mekanizmalarla adipogeneze katkıda bulunurlar. Kan damarları adipositlerin büyümesi ve sürekliliği için gerekli olan besin ve oksijeni sağlarlar. Anjiogenezin adipogenez ve obezitenin düzenlenmesinde önemli bir rolü vardır (Cao, 2007). Kontrol obez grubunda büyüyen yağ dokunun artan besin ve oksijen ihtiyacından dolayı *VEGF-A* ifadesinin daha fazla olduğu görülür. Sıçan *VEGF-A<sub>188</sub>* insan *VEGF-A<sub>189</sub>* homologudur. Bu izoform en fazla bulunan izoformdur. Anjiogenez, büyük ölçüde düzenlenen bir süreçtir; kısa dönemlerde aktive edilir ve sonra tamamen engellenir (Folkman, 2006). Kontrol ve kontrol obezite grupları dışındaki gruplarda ifadenin görülmemesinin nedeni, *VEGF-A*'nın ifade edildikten sonra anjiogenez sürecinde görevini tamamlayarak diğer anjiogenik faktörlere yerini bırakmasından kaynaklanabilir. Neticede AdM ve resveratrol sıçanlara bir ay boyunca uygulanmıştır. Bu sürede *VEGF-A* ifadesi saptanamamış olabilir. Resveratrol ise vazoaaktif peptidlerin sentezini azaltır (Bertelli, 2007). Resveratrol uygulanan gruplarda bu nedenle ifade saptanamamış olabilir veya AdM ve resveratrol *VEGF-A* ifadesini baskılayarak anjiogenezi engellemiş olabilir. Damarların yeniden şekillenmesi, adipoz dokuların genişlemesi ve küçülmesini sağlayan adipositlerin sayısını ve şeklini kontrol eden kan perfüzyonunu değiştirebilir (Cao, 2010). Tümör büyümesinde denendiği gibi, adipoz dokuda anjiogenezinin engellenmesi, BYD büyümesi ve obezite gelişimini engelleyebilir. Anjiostatin (O'Reilly vd., 1994) ve endostatin (O'Reilly vd., 1997) gibi endojen anjiogenez inhibitörlerinin obez farenin vücut ağırlığını azalttığı gösterilmiştir (Rupnick vd., 2002).

*VEGF-A* transkript varyant 2 (*VEGF-A<sub>164</sub>* mRNA) ifadesi kontrol, kontrol obez, obez + resveratrol ve obez + AdM + resveratrol gruplarında görülmüştür. Bu gruplar arasında fark vardır ve diğer gruplarda ifade olmamasından dolayı diğer gruplar arasında da fark vardır ( $p < 0.05$ ). Kontrol grubuna göre kontrol obez grubu %151, obez + resveratrol grubu %130, obez + AdM + resveratrol grubu %41 değerini almaktadır. Kontrol obez grubuna göre kontrol grubu %66, obez + resveratrol grubu %86, obez + AdM + resveratrol grubu %27 değerlerini almaktadır. Obez + resveratrol grubuna göre kontrol grubu %77, kontrol obez grubu %116, obez + AdM + resveratrol grubu %32 değerini almaktadır. Obez + AdM + resveratrol

grubuna göre ise kontrol grubu %244, kontrol obez grubu %369, obez + resveratrol grubu %317 değerini almaktadır. VEGF-A<sub>165</sub> en etkili izoformdur (Duarte vd., 2011). Sıçan VEGF-A<sub>164</sub> homologudur. Transkript varyant 1 gibi 2 de kontrol ve kontrol obez gruplarında ifade edildiği görülmüştür. Transkript varyant 1'e ek olarak, transkript varyant 2 obez + resveratrol ve obez + AdM + resveratrol gruplarında ifade edilmiştir. Bu verilerden resveratrolün obez gruplarda transkript varyant 2'nin ifadesini artırdığı ve AdM'nin resveratrolün bu etkisini baskıladığı sonucu çıkarılabilir. Resveratrol bu etkili izoform mRNA'sının stabilitesini ve ömrünü uzatarak anjiogeneze katkıda bulunmuş olabilir.

VEGF-A transkript varyant 3 (VEGF-A<sub>120</sub> mRNA) ifadesi kontrol, kontrol obez, obez + resveratrol gruplarında görülmüştür. Kontrol ve obez + resveratrol grupları arasında fark yoktur ( $p>0.05$ ) fakat bu gruplarla kontrol obez grubu arasında fark vardır ve diğer gruplarda ifade olmamasından dolayı diğer gruplar arasında fark vardır ( $p<0.05$ ). Kontrol grubuna göre kontrol obez grubu %155; kontrol obez grubuna göre kontrol grubu %65, obez + resveratrol grubu %57; obez + resveratrol grubuna göre ise kontrol obez grubu %176 değerlerini almaktadır. VEGF-A<sub>121</sub> en yaygın izoformdur (Duarte vd., 2011). Diğer varyantlarda olduğu gibi bu varyantın ifadesinin de kontrol obez grubunda arttığı görülmüştür. Obez ve AdM uygulanan gruplarda bu varyantın ifadesinin tamamen baskılandığı görülmektedir. Obez + resveratrol grubunda ise, obez kontrol grubundaki kadar olmasa da ifade vardır. Resveratrolün transkript varyant 3'e olan baskısı AdM kadar güçlü değildir. Belki de resveratrol obez gruplarda VEGF-A ifadesini sabit tutarak anjiogeneze sürecinin ilerlemesini engellemiş olabilir.

BYD'de VEGF-A proteini bütün gruplarda gözlemlenmiştir. Kontrol grubu VEGF-A protein miktarı kontrol + AdM, obez + resveratrol ve obez + AdM + resveratrol gruplarıyla farklılık göstermektedir ( $p<0.05$ ). Kontrol grubuna göre kontrol + AdM grubu %175, obez + resveratrol grubu %44, obez + AdM + resveratrol grubu %731 değerini almaktadır. Vasküler endotel hücrelerde AdM'in AdM reseptörüne bağlanması hücrelerde anjiogeneze gibi sinyal basamaklarına yol açan VEGFR-2 reseptörünün transaktivasyonunu tetikler (Guidolin vd., 2008). AdM ve VEGF arasında sinerjizm vardır (Evans vd., 2012). Önceki çalışmamızda 4 gün süreyle bu deneyle aynı doz (2.5 nmol/kg) AdM uygulaması sonucunda obez ve kalori kısıtlaması yapılan gruplarda BYD'de VEGF-A protein miktarının organizmanın ihtiyacı doğrultusunda olduğu görülmüştür. Bir anjiogenik faktör olan

AdM obez grupta VEGF-A miktarını azaltırken kalori kısıtlaması yapılan grupta artırmıştır (Yurekli ve Culum, 2016). BYD büyümesi ve genişlemesi anjiogeneze bağlıdır (Brakenhielm vd., 2004; Rupnick vd., 2002). AdM uygulaması obez grupta BYD'nin genişlemesini engellerken kalori kısıtlaması yapılan grupta genişlemesine katkıda bulunmuştur (Yurekli ve Culum, 2016). Bu deneyde AdM bir ay boyunca uygulanmıştır. Önceki deneyimizde olduğu gibi AdM'in organizmanın ihtiyacına göre VEGF-A miktarını ayarladığı görülmektedir. Fakat yağlı diyetle etkisini gösteren resveratrol obez + resveratrol ve obez + AdM + resveratrol gruplarında VEGF-A miktarını artırmıştır. Obez + AdM + resveratrol grubunda görülen 7.32 kat artış şaşırtıcıdır. Sonuçlar resveratrolün anjiogeneze rolü olduğunu ve bu etkisinin AdM ile arttığını göstermektedir. AdM ve resveratrolün beraber anjiogeneze etki mekanizmaları daha detaylı araştırılmalıdır.

Kontrol + AdM grubu kontrol + AdM + resveratrol grubuyla aynı VEGF-A protein miktarına sahiptir ( $p>0.05$ ). Fakat bu değer diğer gruplardan farklıdır ( $p<0.05$ ). Kontrol + AdM grubuna göre kontrol grubu %57, kontrol + resveratrol grubu %59, kontrol obez grubu %31, obez + AdM grubu %25, obez + resveratrol grubu %169, obez + AdM + resveratrol grubu %418 değerini almaktadır.

Kontrol + resveratrol grubu; kontrol AdM, obez + resveratrol ve obez + AdM + resveratrol gruplarından farklıdır ( $p<0.05$ ). Kontrol + resveratrol grubuna göre kontrol AdM grubu %70, obez + resveratrol grubu %287, ve obez + AdM + resveratrol grubu %710 değerini almaktadır.

Kontrol + AdM + resveratrol grubu ile VEGF-A protein miktarı açısından kontrol, kontrol + AdM ve kontrol + resveratrol grupları arasında fark yoktur ( $p>0.05$ ). Kontrol + AdM + resveratrol grubuna göre fark olan gruplardan kontrol obez grubu %41, obez + AdM grubu %33, obez + resveratrol grubu %224, obez + AdM + resveratrol grubu %553 değerlerini almaktadır. Bu sonuçlar resveratrolün yüksek yağ diyetiyle etkisini gösterdiğini desteklemektedir.

Kontrol obez grubu VEGF-A protein miktarları açısından kontrol + AdM, kontrol + AdM + resveratrol, obez + resveratrol ve obez + AdM + resveratrol gruplarından farklıdır ( $p<0.05$ ). Kontrol obez grubuna göre kontrol + AdM grubu %324, kontrol + AdM + resveratrol grubu %244, obez + resveratrol grubu %548, obez + AdM + resveratrol grubu %1353 değerlerini almaktadır. BYD vücuttaki enerji durumuna göre kendini düzenleyen bir dokudur. Bu deneyde bir ay AdM uygulamasından sonra kontrol obez ve obez + AdM arasında fark olmaması ve

VEGF-A miktarının düşük olmasının nedeni VEGF-A'nın anjiogenez sürecinde görevini tamamlayarak diğer anjiogenik faktörlere yerini bırakmasından kaynaklanabilir veya VEGF-A kontrol obez grubunda anjiogenezde görevini tamamlarken AdM anjiogenezi baskılamış olabilir. VEGF-A anjiogenez sürecindeki ilk anjiogenik faktördür. Anjiogenik basamakta görev yapan diğer anjiogenik faktörlere de bakılmalıdır.

Obez + AdM grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında kontrol + AdM, kontrol + AdM + resveratrol, obez + resveratrol ve obez + AdM + resveratrol gruplarından farklıdır ( $p < 0.05$ ). Obez + AdM grubuna göre kontrol + AdM grubu %398, kontrol + AdM + resveratrol grubu %300, obez + resveratrol grubu %673 ve obez + AdM + resveratrol grubu %1661 değerlerini almaktadır.

Obez + resveratrol grubu VEGF-A protein miktarı açısından diğer bütün gruplardan farklıdır ( $p < 0.05$ ). Obez + resveratrol grubuna göre kontrol grubu %34, kontrol + AdM grubu %59, kontrol + resveratrol grubu %39, kontrol + AdM + resveratrol grubu %45, kontrol obez grubu %18, obez + AdM grubu %15, obez + AdM + resveratrol grubu %247 değerini almaktadır.

Obez + AdM + resveratrol grubu VEGF-A protein miktarı açısından diğer bütün gruplardan farklıdır ( $p < 0.05$ ). Obez + AdM + resveratrol grubuna göre kontrol grubu %14, kontrol + AdM grubu %24, kontrol + resveratrol grubu %14, kontrol + AdM + resveratrol grubu %18, kontrol obez grubu %7, obez + AdM grubu %6, obez + resveratrol grubu %41 değerini almaktadır.

## 5.6 KYD VEGF-A Sonuçları

KYD'de *VEGF-A* ifadesi tespit edilememiştir. Adipoz doku ve özellikle KYD, her yağ hücresi kapillerlerle kuşatıldığından dolayı, olasılıkla vücutta en çok damarlanan dokudur (Cao, 2007). KYD, BYD'den daha fazla damar ve noradrenerjik sinirler içerir. BYD kronik soğuğa maruz kaldığında KYD'ye dönüşebilir, obeziteye yol açan diyet ise KYD'nin BYD'ye dönüşmesine neden olabilir (Miao ve Li, 2012). Damarlanması bu kadar fazla olan bu dokuda ya anjiogenez sağlanamamış ya da bir aylık uygulama sonucunda *VEGF-A* ifadesinin fazla olduğu dönem yakalanamamış olabilir.

KYD'de VEGF-A protein seviyesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kontrol + AdM grubuyla aynı ( $p > 0.05$ ), diğer gruplarla farklıdır ( $p < 0.05$ ). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kontrol + resveratrol grubu %44, kontrol + AdM + resveratrol

grubu %29, kontrol obez grubu %22, obez + AdM grubu %46, obez + resveratrol grubu %69, obez + AdM + resveratrol grubu %28 değerlerini almaktadır. BYD ile karşılaştırıldığında KYD'de değerlerin farklı olduğu görülmektedir. KYD'nin fonksiyonunun arttırılması veya BYD'de kahverengi adiposit benzeri genlerin uyarılması, obeziteye karşı dirençle uyum göstermektedir (Cannon ve Nedergaard, 2004). Önceki çalışmamızda 4 gün süreyle AdM uygulaması sonucunda obez ve kalori kısıtlaması yapılan gruplarda, KYD'de VEGF-A protein miktarının önemli miktarda arttığı görülmüştür. AdM hem obez grupta hem de kalori kısıtlaması yapılan grupta VEGF-A miktarını arttırmıştır. Bu artış obez grupta kalori kısıtlaması grubunun yaklaşık 2.5 katıdır. Kontrol ve obezite gruplarıyla karşılaştırıldığında, AdM uygulanan obez grupta enerji tüketiminden sorumlu olan interskapüler kahverengi yağ dokusunun arttığı görülmüştür. Kontrol ve kalori kısıtlaması yapılan gruplarla karşılaştırıldığında ise AdM uygulanan kalori kısıtlaması grubunda vücutta enerji depolamaktan sorumlu BYD dokusunun arttığı görülmüştür. Bu çalışmaya göre AdM, bireyin adipoz dokusunun metabolik durumuna göre hangi adipoz dokunun damarlanmasının artırılması gerektiğini ayarlamaktadır. AdM; obez bireylerde KYD, zayıf bireylerde ise BYD dokusunun anjiogenezini artırmıştır (Yurekli ve Culum, 2016). Bu deneyde böyle bir artış saptanamamıştır. Deneyimizdeki uygulama süresi nedeniyle VEGF-A miktarındaki artış saptanamamış olabilir. Dokudaki damarlanmanın saptanması için hem deneyden önce hem de deneyden sonra dopler gibi damarlanmayı görüntüleyen bir yöntem uygulanabilir. Görüntülerden damarlanmanın durumuyla ilgili detaylı veriler elde edilebilir. Ek olarak diğer anjiogenik faktörlerin miktarına ve ifadesine bakılabilir.

Kontrol + AdM grubu VEGF-A protein seviyeleri açısından kontrol grubu ( $p>0.05$ ) dışındaki bütün gruplardan farklıdır. Kontrol + resveratrol grubu %43, kontrol + AdM + resveratrol grubu %28, kontrol obez grubu %22, obez + AdM grubu %45, obez + resveratrol grubu %68, obez + AdM + resveratrol grubu %28 değerlerini almaktadır.

Kontrol + resveratrol grubu VEGF-A protein seviyesi kontrol + AdM + resveratrol, obez + AdM ve obez + AdM + resveratrol gruplarıyla aynı ( $p>0.05$ ), diğer gruplarla farklıdır ( $p<0.05$ ). Kontrol + resveratrol grubuna göre kontrol grubu %227, kontrol + AdM grubu %232, kontrol obez grubu %50, obez + resveratrol grubu %157 değerlerini almaktadır. Değerlere göre resveratrol KYD kontrol grubunda vazoaktif peptitlerin sentezini azaltma etkisini göstermektedir.

Kontrol + AdM + resveratrol grubu protein miktarı açısından kontrol, kontrol + AdM ve obez + resveratrol gruplarından farklıdır ( $p < 0.05$ ). Bu gruba göre kontrol grubu %345, kontrol + AdM grubu %352, obez + resveratrol grubu %241 değerini almaktadır.

Kontrol obez grubu VEGF-A protein seviyesi kontrol + AdM + resveratrol ve obez + AdM + resveratrol gruplarıyla aynı ( $p > 0.05$ ), diğer gruplarla farklıdır. Kontrol obez grubuna göre kontrol grubu %455, kontrol + AdM grubu %464, kontrol + AdM + resveratrol grubu %200, obez + AdM grubu %210, obez + resveratrol grubu %314 değerlerini almaktadır. Yapılan çalışmalar fazla kilolu ve obez kişilerin KYD aktivitesinin, zayıf kişilere göre daha düşük olduğunu göstermiştir (van Marken Lichtenbelt vd., 2009).

Obez + AdM grubu VEGF-A protein miktarı açısından kontrol, kontrol + AdM, kontrol obez ve obez + resveratrol gruplarından farklıdır ( $p < 0.05$ ). Bu gruba göre kontrol grubu 217, kontrol + AdM grubu %222, kontrol obez grubu %48, obez + resveratrol grubu %150 değerlerini almaktadır.

VEGF-A protein seviyelerine bakıldığında obez + resveratrol grubu diğer bütün gruplardan farklılık göstermektedir ( $p < 0.05$ ). Bu gruba göre kontrol grubu %145, kontrol + AdM grubu %148, kontrol + resveratrol grubu %64, kontrol + AdM + resveratrol grubu %42, kontrol obez grubu %32, obez + AdM grubu %67, obez + AdM + resveratrol grubu %41 değerlerini almaktadır. Yüksek yağ diyeti sonucu obez gruplarda resveratrolün etkisinin farklı olduğu görülmüştür. Kontrol obez grubuna göre obez + resveratrol grubunda VEGF-A miktarının arttığı görülmüştür. Fakat kontrol grubunda bunun tersi bir durum gözlenmiştir. Bunun nedeni yüksek yağ diyeti ya da obezitede değişen metabolizma olabilir. KYD'nin obezitede fonksiyonunu artırmak için resveratrol kullanılabilir. KYD'deki vasküler perfüzyonun artırılması, yakıtları yakmak için gereken oksijen moleküllerini sağlayarak metabolik hızı daha da artırabilir (Cao, 2007). Resveratrolün KYD'de hangi metabolik yollara karıştırıldığıyla ilgili daha detaylı çalışmalar yapılmalıdır. UCP1 oksidatif fosforolasyon, yağ asiti alımı ve metabolizması gibi birçok faktörden etkilenir (Kajimura ve Saito, 2014). Resveratrol güçlü antioksidan, antiinflamator ve antikarsinojenik bir polifenoldür. Antioksidan aktivitesini AMPK'ları aktive ederek, reaktif oksijen türlerini engelleyerek gösterir. Böylece COX-2 ve lipid peroksidasyonunu baskılar (Szabo, 2009). Resveratrol bu özellikleriyle büyük

olasılıkla UCP1'i etkiler. KYD'nin fonksiyondaki artışı saptamak için muhakkak UCP1 ve diğer KYD'ye özgü molekül seviyelerine ve ifadesine bakılmalıdır.

Obez + AdM + resveratrol protein seviyeleri kontrol, kontrol + AdM ve obez + resveratrol gruplarından farklıdır ( $p < 0.05$ ). Kontrol grubu %357, kontrol + AdM grubu %364, obez + resveratrol grubu %246 değerlerini almaktadır. Kontrol ve obez gruplarda resveratrol ve AdM'in beraber uygulanması VEGF-A miktarında belirgin bir düşüşe neden olmuştur. İki molekül beraber uygulandığında kendi özelliklerinden tamamen farklı özellikler ortaya çıkarmışlardır. AdM ve resveratrolün birbirlerine olan etkileri KYD ve BYD dokularında detaylı olarak incelenmelidir. İki molekül bu zamana kadar çalışılan moleküllerden ve yolaklardan farklı molekül ve yolları etkileyebilirler.

Muhtemelen damarlanmanın fazla olduğu KYD'de AdM ve resveratrol uygulaması anjiogeneze bir katkı sağlamamış, aksine VEGF-A protein miktarlarında azalmaya neden olmuştur. BYD'deki damarlanmanın artışı dokunun büyümesine neden olurken, KYD'deki damarlanmanın artışı bu dokuda daha fazla yakıtın tüketilmesine neden olur. Obezitenin nedenlerinden biri olarak KYD'nin aktivitesinde düşüş gösterilmektedir. Deney gruplarında damarlanmanın bir göstergesi olarak VEGF-A protein miktarı göz önüne alındığında, KYD damarlanmasındaki düşüş ve obez gruplardaki artış sıçanlarda kilo artışıyla doğru orantılıdır.

Adipoz dokusunun genişlemesi, damarlanmasının gelişimine bağlıdır. Fakat insanlarda adipoz dokusu anjiogenezinin düzenlenmesi geniş bir şekilde çalışılmamıştır. Obez hastalardan alınan subkutan ve visceral yağ dokuları karşılaştırıldığında anjiogenik potansiyelleri ve VEGF-A seviyeleri arasında bir fark görülmemiştir (Ledoux vd., 2008). Hızlı anjiyogenez, hayvan soğuğa maruz kaldığında KYD'nin adaptif hiperplazisi sonucu oluşmaktadır. KYD dokusunda soğuk etkisi dolayısıyla anjiogenezin meydana gelişi, VEGF ve bFGF mRNA seviyelerinin saptanmasıyla gösterilmiştir (Asano vd., 1999). Obezite esnasında genişleyen adipoz doku hipoksik hale gelmektedir (Kabon vd., 2004), ve yağ dokularında farklılaşma ve hipoksiya yağ hücrelerinde VEGF ifadesini uyarmaktadır (Zhang vd., 1997).

Resveratrol dolaşımında albumine bağlanır. Albuminin resveratrolü taşımada ve biyoelverişliliğinde rolü olduğu düşünülmektedir (Jannin vd., 2004). Yağ asitlerinin varlığı resveratrolün albümine bağlanmasını iki kat artırır (Jannin vd., 2004). Bu



nedenle bütün deney gruplarında dolaşımdaki albümin seviyelerine bakmak resveratrolün biyoverimliliği hakkında bilgi verebilir.

Obezite, beyaz yağ dokusu kütesinin artışına yol açan enerji dengesinin bozulması ile bağlantılıdır. Bu nedenle, yağ dokusunun gelişimini düzenleyen adipokinlere özel önem verilmeye başlanmıştır. AdM insan ve hayvan yağ dokularından salgılanan adipokin ailesinin bir üyesi olduğu gösterilmiştir (Harmancey vd., 2007). AdM ve resveratrol uygulamasının etkilerinin daha detaylı olarak araştırılması için AdM dışındaki adipokinlere de bakılmalıdır.

Obez bireylerdeki endotelial işlevin normalleştirilmesi birçok hastalığın tedavisi ve hastalıktan korunmada önemli bir yaklaşımdır (Cao, 2010). AdM hipertansiyonun neden olduğu negatif etkileri azaltmakta ve damarları bu etkilere karşı korumaktadır. Günümüzde AdM, hipertansiyonlu hastalarda reçeteli ilaç olarak kullanılmaktadır. Obezite ve koroner arter hastalığı gibi durumlarda AdM düzeyinin arttığı ve organizmayı hastalıkların meydana getirdiği sendromlara karşı koruduğu gösterilmiştir. Deney gruplarında endotelial işlevlerle ilgili durumların incelenmesi AdM ve resveratrolün obezitenin meydana getirdiği negatif etkilerin normalleştirilmesi hakkında veri elde edilmesini sağlayacaktır.

Çalışmada BYD'nin kahverengileştirilmesiyle ilgili parametrelere bakılmamıştır. BYD'de yer alan bej veya brite hücreleri kahverengi adipositler ile ayrı gelişimsel kökenlerden farklılaşırlar. Bej hücreler multiloküler lipid damlacıkları, fazla mitokondri ve *Ucp1* ifade etmeleriyle kahverengi adipositlere benzerler (Kajimura ve Saito, 2014). AdM lipolizi uyarır ve KYD'de UCP1 seviyesini artırır. Bu yüzden serbest yağ asiti substratlarının mevcudiyetini ve mitokondriyal membranda UCP1 seviyesini artırarak termogenezi artırabilir (Go vd., 2007). BYD'deki bej hücre miktarı, *Ucp1* ifadesi, PRDM16 gibi parametreler BYD'de sağlanan kahverengileşmeyi değerlendirmek için kullanılabilir. Ek olarak KYD'de *Ucp1* ifadesini arttıran FOXC2 ve apelin gibi parametrelere bakılabilir. Mitokondriler enerji metabolizmasında çok önemlidir. Resveratrol olgun adipositlerde lipolizi artırır ve lipogenezi azaltma etkisini adipositlere özgü transkripsiyon faktörlerini, enzimlerini azaltarak ve mitokondriyal işlevi düzenleyen genler aracılığıyla sağlar (Rayalam vd., 2008). Mitokondri sayılarına bakmak AdM ve resveratrol uygulamasının enerji metabolizması üzerine olan etkisini belirlemede önemlidir.

Bu çalışma kapsamında bilimsel araştırma yapılmasının yanı sıra obezitenin tedavisine yönelik yaklaşımın da bir farkındalık yaratılmaya çalışılmıştır. Beslenme, spor ya da cerrahi bir müdahale ile obeziteye müdahale edilmesinin yanı sıra, anjiogenik faktörlerin proteomik analizinin de dikkate alınması, akla getirilmesi, düşünülmesi bu çalışmadan elde edilecek sonuçlarla sağlanabilecektir.

AdM ve resveratrolün herhangi bir yan etkisi ve doz aşımında toksik etkileri bulunmamaktadır. Önceki çalışmamızda sıçanlara 2,5 nmol/kg, yüksek bir dozda, AdM 4 gün süreyle uygulanmış ve herhangi bir negatif etki gözlenmemiştir (Yurekli ve Culum, 2016).

Yağ dokusu, beyin dokusuyla beraber, çalışması en zor olan dokulardan biridir. Yağ miktarının fazla olması, buna karşın diğer içeriklerin az olması bu dokuyla çalışmayı ve yağı uzaklaştırarak saf protein ve RNA örnekleri elde etmeyi zorlaştırmaktadır. Yağ dokusunun %2 gibi düşük protein içeriği, Western blotlama gibi yöntemlerde keskin olmayan bantlara neden olabilmektedir. Bu içerik SDS-PAGE'de yüklenen proteinin konsantrasyonunu artırmayı olanaksız kılmaktadır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler semi-kantitatifdir. Daha kesin sonuçlar elde edilmek isteniyorsa ELİZA gibi kantitatif teknikler kullanılmalıdır.

BYD ve KYD dokusu resveratrol ve AdM uygulamalarına farklı tepkiler vermektedir. Deney sonuçlarına bakılacak olursa bu uygulamalar BYD dokusunda olumlu etkilere neden olmaktadır. AdM'in BYD dokusunda SIRT1 düzeyine olan etkisi daha detaylı incelenmelidir. Son zamanlarda kişinin kilosunun değil metabolizmasının sağlık açısından önemli olduğu ileri sürülmektedir. BYD metabolik olarak aktif bir dokudur. Bu çalışmada normal ve obez gruplar arasında sağlık durumuyla ilgili parametrelere bakılması, AdM ve resveratrolün bu parametrelere olan düzeltici etkilerinin ortaya çıkarılmasına yardımcı olacaktır.

İnsan genom projesinin tamamlanmasıyla birlikte insan genleri ile ilgili önemli bilgiler elde edilmiş ve artık hangi kromozomda hangi proteinlerin şifrelerinin olduğu saptanmıştır. Normal şartlarda herhangi bir gen ürünü tüm insanlarda aynı protein için şifredir. Ancak bireyler arasında farklılığı sağlayan en önemli faktörlerden birisi proteinin işlevidir ve buna bağlı olarak peptid yapısında olan anjiogenik faktörlerin işlevleri de farklı olabilir. Obezitenin teşhisinde yapılması gerekenlerden birisi de belki bireysel anjiogenik faktör haritasının/işlevinin çıkarılması olmalıdır.

Tarafımızdan yapılan ancak yayınlanmamış olan verilere göre kalori kısıtlaması yapılan ve resveratrol verilen sıçanlarda adrenomedullin düzeylerinin arttığı, hatta kardiyotoksik ve oksidatif etkisi olan kanser tedavisinde kullanılan doxorubicine verilen sıçanlarda da resveratrol uygulamasına bağlı olarak adrenomedullin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Enerji metabolizmasının düzenlenmesinde rolü olan *SIRT1* gen ifadesi üzerine etkili olan resveratrol, adrenomedullinin etkileri sıçanların kahverengi ve beyaz yağ dokularındaki anjiyogenik faktörler ölçülerek değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, laboratuvar koşullarında oluşturulan obez hayvanlarda, çoklu etkiye sahip olan aynı zamanda anjiyogenik faktör olan adrenomedullin ve resveratrolun etkilerinin araştırılması obezite ile ilgili yapılan çalışmaların farklı bilimsel yaklaşımlar sağlayacaktır.

## 6 KAYNAKLAR

- Abizaid, A., Gao, Q., & Horvath, T. L. (2006). Thoughts for Food: Brain Mechanisms and Peripheral Energy Balance. *Neuron*. Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.025>
- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., & Takada, Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, 24(5A), 2783–840. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15517885>
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (1994). *Molecular biology of the cell* (3rd Ed). Garland, New York: Garland Pub.
- Allaker, R. P., Zihni, C., & Kapas, S. (1999). An investigation into the antimicrobial effects of adrenomedullin on members of the skin, oral, respiratory tract and gut microflora. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 23(4), 289–293.  
[https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(98\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(98)00148-5)
- Allard, J. S., Heilbronn, L. K., Smith, C., Hunt, N. D., Ingram, D. K., Ravussin, E., Pennington CALERIE Team, de Cabo, R. (2008). In vitro cellular adaptations of indicators of longevity in response to treatment with serum collected from humans on calorie restricted diets. *PLoS ONE*, 3(9), e3211.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003211>
- Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7617530>
- Amjadi, F., Javanmard, S. H., Zarkesh-Esfahani, H., Khazaei, M., & Narimani, M. (2011). Leptin promotes melanoma tumor growth in mice related to increasing circulating endothelial progenitor cells numbers and plasma NO production. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 30(1), 21.  
<https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-21>
- Amri, A., Chaumeil, J. C., Sfar, S., & Charrueau, C. (2012). Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*, 158(2), 182–193.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.083>

- Asano, A., Kimura, K., & Saito, M. (1999). Cold-induced mRNA expression of angiogenic factors in rat brown adipose tissue. *The Journal of Veterinary Medical Science*, *61*(4), 403–9.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10342292>
- Athar, M., Back, J. H., Tang, X., Kim, K. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., & Kim, A. L. (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *224*(3), 274–283.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.025>
- Bai, L., Pang, W.-J., Yang, Y.-J., & Yang, G.-S. (2007). Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *307*(1–2), 129–140.  
<https://doi.org/10.1007/s11010-007-9592-5>
- Baliga, M. S., Meleth, S., & Katiyar, S. K. (2005). Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. *Clinical Cancer Research*, *11*(5), 1918–1927. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1976>
- Baluk, P., Hashizume, H., & McDonald, D. M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, *15*(1), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.12.005>
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J. P., De Matteis, R., Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, *298*(6), E1244–E1253.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00600.2009>
- Barger, J. L., Kayo, T., Vann, J. M., Arias, E. B., Wang, J., Hacker, T. A., Hacker, T. A., Wang, Y., Raederstorff, D., Morrow, J. D., Leeuwenburgh, C., Allison, D. B., Saupe, K. W., Cartee, G. D., Weindruch, R., Prolla, T. A. (2008). A Low Dose of Dietary Resveratrol Partially Mimics Caloric Restriction and Retards Aging Parameters in Mice. *PLoS ONE*, *3*(6), e2264.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002264>

- Basly, J. P., Marre-Fournier, F., Le Bail, J. C., Habrioux, G., & Chulia, A. J. (2000). Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sciences*, *66*(9), 769–777.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698352>
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Lakatta, E. G., Le Couteur, D., Shaw, R. J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D. K., de Cabo, Rafael Sinclair, D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, *444*(7117), 337–42. <https://doi.org/10.1038/nature05354>
- Baxter, R. A. (2008). Anti-aging properties of resveratrol: Review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *7*(1), 2–7. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2008.00354.x>
- Bene, R. Del, Lazzeri, C., Barletta, G., Vecchiarino, S., Guerra, C. T., Franchi, F., & La Villa, G. (2000). Effects of low-dose adrenomedullin on cardiac function and systemic haemodynamics in man. *Clinical Physiology*, *20*(6), 457–465. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2281.2000.00284.x>
- Bertelli, A. A. E. (2007). Wine, research and cardiovascular disease: Instructions for use. *Atherosclerosis*, *195*(2), 242–247.  
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.006>
- Betsholtz, C. (2004). Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *15*(4), 215–228. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.005>
- Blasi, F., & Carmeliet, P. (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *3*(12), 932–943.  
<https://doi.org/10.1038/nrm977>
- Boon, M. R., van den Berg, S. A. A., Wang, Y., van den Bossche, J., Karkampouna, S., Bauwens, M., De Saint-Hubert, M., van der Horst, G., Vukicevic, S., de Winther, M. P. J., Havekes, L. M., Jukema, J. W., Tamsma, J. T., van der Pluijm, G., van Dijk, K. W., Rensen, P. C. N. (2013). BMP7 Activates Brown

- Adipose Tissue and Reduces Diet-Induced Obesity Only at Subthermoneutrality. *PLoS ONE*, 8(9), e74083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074083>
- Brakenhielm, E., Cao, R., Gao, B., Angelin, B., Cannon, B., Parini, P., & Cao, Y. (2004). Angiogenesis Inhibitor, TNP-470, Prevents Diet-Induced and Genetic Obesity in Mice. *Circulation Research*, 94(12), 1579–1588. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000132745.76882.70>
- Bronnikov, G., Houstěk, J., & Nedergaard, J. (1992). Beta-adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via beta 1 but not via beta 3 adrenoceptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 2006–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1346138>
- Brown, L. F., Yeo, K. T., Berse, B., Yeo, T. K., Senger, D. R., Dvorak, H. F., & van de Water, L. (1992). Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(5), 1375–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1402682>
- Bunton, D. C., Petrie, M. C., Hillier, C., Johnston, F., & McMurray, J. J. V. (2004). The clinical relevance of adrenomedullin: a promising profile? *Pharmacology & Therapeutics*, 103(3), 179–201. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.07.002>
- Calabrese, G. (1999). Nonalcoholic compounds of wine: the phytoestrogen resveratrol and moderate red wine consumption during menopause. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 25(2–3), 111–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10370872>
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277–359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>
- Canto, C., & Auwerx, J. (2012). Targeting Sirtuin 1 to Improve Metabolism: All You Need Is NAD+? *Pharmacological Reviews*, 64(1), 166–187. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003905>
- Cao, Y. (2007). Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *Journal of Clinical Investigation*, 117(9), 2362–2368. <https://doi.org/10.1172/JCI32239>

- Cao, Y. (2010). Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(2), 107–115. <https://doi.org/10.1038/nrd3055>
- Cao, Y., Linden, P., Farnebo, J., Cao, R., Eriksson, A., Kumar, V., Qi, J. H., Claesson-Welsh, L., Alitalo, K. (1998). Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24), 14389–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826710>
- Carando, S., Teissedre, P. ., Waffo-Téguo, P., Cabanis, J. ., Deffieux, G., & Mérillon, J. . (1999). High-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection for the determination of trans-astringin in wine. *Journal of Chromatography A*, 849(2), 617–620. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00595-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00595-6)
- Carey, A. L., & Kingwell, B. A. (2013). Brown adipose tissue in humans: therapeutic potential to combat obesity. *Pharmacology & Therapeutics*, 140(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.05.009>
- Carey Satterfield, M., Dunlap, K. A., Keisler, D. H., Bazer, F. W., & Wu, G. (2012). Arginine nutrition and fetal brown adipose tissue development in diet-induced obese sheep. *Amino Acids*, 43(4), 1593–1603. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1235-9>
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, 9(6), 653–660. <https://doi.org/10.1038/nm0603-653>
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573), 435–439. <https://doi.org/10.1038/380435a0>
- Cederberg, A., Grønning, L. M., Ahrén, B., Taskén, K., Carlsson, P., Enerbäck, S., Giralt, M., Villarroya, F., Spiegelman, B.M. Scarpulla, R.C., Spiegelman, B. M. (2001). FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell*, 106(5), 563–73. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00474-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00474-3)



- Charles, C. J., Rademaker, M. T., Richards, A. M., Cooper, G. J. S., Coy, D. H., & Nicholls, M. G. (1998). Hemodynamic, Hormonal, and Renal Effects of Intracerebroventricular Adrenomedullin in Conscious Sheep. *Endocrinology*, *139*(4), 1746–1751. <https://doi.org/10.1210/endo.139.4.5862>
- Chen, S., Chakrabarti, R., Keats, E. C., Chen, M., Chakrabarti, S., & Khan, Z. A. (2012). Regulation of vascular endothelial growth factor expression by extra domain B segment of fibronectin in endothelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *53*(13), 8333–8343. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9766>
- Cheyuo, C., Yang, W., & Wang, P. (2012). The critical role of adrenomedullin and its binding protein , AMBP-1 , in neuroprotection, *393*(June), 429–439. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0103>
- Clark, S. J., Falchi, M., Olsson, B., Jacobson, P., Cauchi, S., Balkau, B., Marre, M, Lantieri, O. Andersson, J. C., Jernås, M., Aitman, T. J., Richardson, S., Sjöström, L., Wong, H. Y., Carlsson, L. M. S. Froguel, P., Walley, A. J. (2012). Association of Sirtuin 1 (SIRT1) Gene SNPs and Transcript Expression Levels With Severe Obesity. *Obesity*, *20*(1), 178–185. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.200>
- Cleaver, O., & Melton, D. A. (2003). Endothelial signaling during development. *Nature Medicine*, *9*(6), 661–668. <https://doi.org/10.1038/nm0603-661>
- Cohen, H. Y., Miller, C., Bitterman, K. J., Wall, N. R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K. T., Gorospe, M., de Cabo, R., Sinclair, D. A. (2004). Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science (New York, N.Y.)*, *305*(5682), 390–2. <https://doi.org/10.1126/science.1099196>
- Comuzzie, A. G., Williams, J. T., Martin, L. J., & Blangero, J. (2001). Searching for genes underlying normal variation in human adiposity. *Journal of Molecular Medicine*, *79*(1), 57–70. <https://doi.org/10.1007/s001090100202>
- Costa, C., Soares, R., & Schmitt, F. (2004). Angiogenesis: now and then. *APMIS*, *112*(7–8), 402–412. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0802.x>

- Costford, S., Gowing, A., & Harper, M.-E. (2007). Mitochondrial uncoupling as a target in the treatment of obesity. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *10*(6), 671–678.  
<https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3282f0dbe4>
- Cousin, B., Bascands-Viguerie, N., Kassis, N., Nibbelink, M., Ambid, L., Casteilla, L., & Pénicaud, L. (1996). Cellular changes during cold acclimation in adipose tissues. *Journal of Cellular Physiology*, *167*(2), 285–289.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199605\)167:2<285::AID-JCP12>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199605)167:2<285::AID-JCP12>3.0.CO;2-7)
- Crujeiras, A. B., Parra, D., Goyenechea, E., & Martínez, J. A. (2008). Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction. *European Journal of Clinical Investigation*, *38*(9), 672–678.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.01998.x>
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, Frank C., Palmer, E. L., Tseng, Y-H., Doria, A., Kolodny, G. M., Kahn, C. R. (2009). Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1509–1517.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810780>
- Das, S., Lin, H.-S., Ho, P. C., & Ng, K.-Y. (2008). The Impact of Aqueous Solubility and Dose on the Pharmacokinetic Profiles of Resveratrol. *Pharmaceutical Research*, *25*(11), 2593–2600. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9677-1>
- Digby, J. E., Montague, C. T., Sewter, C. P., Sanders, L., Wilkison, W. O., O’Rahilly, S., & Prins, J. B. (1998). Thiazolidinedione Exposure Increases the Expression of Uncoupling Protein 1 in Cultured Human Preadipocytes. *Diabetes*, *47*(1).  
 Retrieved from <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/47/1/138.short>
- Distler, J. H. W., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R. E., Gay, S., & Distler, O. (2003). Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine : Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR)*, *47*(3), 149–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897707>

- Duarte, D., Santos-Araújo, C., & Leite-Moreira, A. F. (2011). Hypertension and angiogenesis in the aging kidney: A review. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 52(3), e93–e102. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2010.11.032>
- Eble, J. A., & Niland, S. (2009). The extracellular matrix of blood vessels. *Current Pharmaceutical Design*, 15(12), 1385–400.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19355976>
- Eilken, H. M., & Adams, R. H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(5), 617–625. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.010>
- Ensembl genome browser. (a). Gene: SIRT1 (ENSG00000096717) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 89. Retrieved June 3, 2017, from [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000096717;r=10:67884669-67918390](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000096717;r=10:67884669-67918390)
- Ensembl genome browser. (b). Gene: Sirt1 (ENSRNOG00000051592) - Splice variants - Rattus norvegicus - Ensembl genome browser 89.  
Retrieved June 3, 2017, from [http://www.ensembl.org/Rattus\\_norvegicus/Gene/Splice?db=core;g=ENSRNOG00000051592;r=20:26833357-26852199;t=ENSRNOT00000078739](http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/Gene/Splice?db=core;g=ENSRNOG00000051592;r=20:26833357-26852199;t=ENSRNOT00000078739)
- Estep, P. W., Warner, J. B., Bulyk, M. L., Williams, P., & DiYagama, D. (2009). Short-Term Calorie Restriction in Male Mice Feminizes Gene Expression and Alters Key Regulators of Conserved Aging Regulatory Pathways. *PLoS ONE*, 4(4), e5242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005242>
- Evans, J. J., Chitcholtan, K., Dann, J. M., Guilford, P., Harris, G., Lewis, L. K., Nagase, J., Welkamp, A. A. W., Zwerus, R., Sykes, P. H. (2012). Adrenomedullin interacts with VEGF in endometrial cancer and has varied modulation in tumours of different grades. *Gynecologic Oncology*, 125(1), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.12.429>
- Ferrara, N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 280(6), C1358-66.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350730>

- Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer*, 2(10), 795–803. <https://doi.org/10.1038/nrc909>
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380(6573), 439–442. <https://doi.org/10.1038/380439a0>
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6), 669–676. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>
- Fischer-Posovszky, P., Kukulus, V., Tews, D., Unterkircher, T., Debatin, K. M., Fulda, S., & Wabitsch, M. (2010). Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92(1), 5–15. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28435>
- Folkman, J. (1992). *Biologic Therapy of Cancer*. (V. DeVita, S. Hellman, & S. A. Rosenberg, Eds.). J.B. Lippincott Co.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*, 1(1), 27–31.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584949>
- Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annual Review of Medicine*, 57(1), 1–18. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131306>
- Fredriksson, L., Li, H., & Eriksson, U. (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 15(4), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.007>
- Frühbeck, G., Becerril, S., Sáinz, N., Garrastachu, P., & García-Velloso, M. J. (2009). BAT: a new target for human obesity? *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(8), 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.05.003>
- Frye, R. A. (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 260(1), 273–9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0897>
- Fukai, N., Yoshimoto, T., Sugiyama, T., Ozawa, N., Sato, R., Shichiri, M., & Hirata, Y. (2004). Concomitant expression of adrenomedullin and its receptor

- components in rat adipose tissues. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 288(1), E56–E62. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00586.2003>
- Fukuda, K., Tsukada, H., Oya, M., Onomura, M., Kodama, M., Nakamura, H., Hosokawa, M., Seino, Y. (1999). Adrenomedullin promotes epithelial restitution of rat and human gastric mucosa in vitro. *Peptides*, 20(1), 127–132. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)00146-6)
- Garayoa, M., Bodegas, E., Cuttitta, F., & Montuenga, L. M. (2002). Adrenomedullin in mammalian embryogenesis. *Microscopy Research and Technique*, 57(1), 40–54. <https://doi.org/10.1002/jemt.10050>
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*, 161(6), 1163–1177. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>
- Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J. T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S.-H., Mostoslavsky, R., Alt, F. W., Wu, Z., Puigserver, P. (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 $\alpha$ . *The EMBO Journal*, 26(7), 1913–1923. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601633>
- Gesta, S., Tseng, Y.-H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*, 131(2), 242–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004>
- Go, A. G. G., Chow, K. H. M., Hwang, I. S. S., & Tang, F. (2007). Adrenomedullin and its receptor components in adipose tissues: Differences between white and brown fats and the effects of adrenergic stimulation. *Peptides*, 28(4), 920–927. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.12.007>
- Golozoubova, V., Hohtola, E., Matthias, A., Jacobsson, A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2001). Only UCP1 can mediate adaptive nonshivering thermogenesis in the cold. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(11), 2048–50. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0536fje>
- Granneman, J. G., Li, P., Zhu, Z., & Lu, Y. (2005). Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of  $\beta$ 3-adrenergic receptor activation. *American*

*Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 289(4). Retrieved from <http://ajpendo.physiology.org/content/289/4/E608.short>

- Grundlingh, J., Dargan, P. I., El-Zanfaly, M., & Wood, D. M. (2011). 2,4-Dinitrophenol (DNP): A Weight Loss Agent with Significant Acute Toxicity and Risk of Death. *Journal of Medical Toxicology*, 7(3), 205–212. <https://doi.org/10.1007/s13181-011-0162-6>
- Guerrero, R. F., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2009). Wine, resveratrol and health: a review. *Natural Product Communications*, 4(5), 635–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19445315>
- Guidolin, D., Albertin, G., Spinazzi, R., Sorato, E., Mascarini, A., Cavallo, D., Antonello, M., Ribatti, D. (2008). Adrenomedullin stimulates angiogenic response in cultured human vascular endothelial cells: Involvement of the vascular endothelial growth factor receptor 2. *Peptides*, 29(11), 2013–2023. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.07.009>
- Harmancey, R., Senard, J.-M., Pathak, A., Desmoulin, F., Claparols, C., Rouet, P., & Smih, F. (2005). The vasoactive peptide adrenomedullin is secreted by adipocytes and inhibits lipolysis through NO-mediated -adrenergic agonist oxidation. *The FASEB Journal*, 19(8), 1045–7. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2868fje>
- Harmancey, R., Senard, J.-M., Rouet, P., Pathak, A., & Smih, F. (2007). Adrenomedullin inhibits adipogenesis under transcriptional control of insulin. *Diabetes*, 56(3), 553–63. <https://doi.org/10.2337/db06-0857>
- Higuchi, K., Masaki, T., Gotoh, K., Chiba, S., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., Yoshimatsu, H. (2007). Apelin, an APJ Receptor Ligand, Regulates Body Adiposity and Favors the Messenger Ribonucleic Acid Expression of Uncoupling Proteins in Mice. *Endocrinology*, 148(6), 2690–2697. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1270>
- Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 279(3). Retrieved from <http://ajpcell.physiology.org/content/279/3/C670>

- Hinson, J. O. Y. P., Kapas, S., & Smith, D. M. (2000). Adrenomedullin, a Multifunctional Regulatory Peptide. *Endocrine Reviews*, *21*(2), 138–167.
- Hirata, Y., Mitaka, C., Sato, K., Nagura, T., Tsunoda, Y., Amaha, K., & Marumo, F. (1996). Increased circulating adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in sepsis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *81*(4), 1449–1453. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.4.8636349>
- Hirschi, K. K., & D'Amore, P. A. (1996). Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular Research*, *32*(4), 687–98.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8915187>
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T., & De Bruijn, E. A. (2004). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews*, *56*(4), 549–580. <https://doi.org/10.1124/pr.56.4.3>
- Hood, J. D., Meininger, C. J., Ziche, M., & Granger, H. J. (1998). VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *The American Journal of Physiology*, *274*(3 Pt 2), H1054-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9530221>
- Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., & Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(36), 26031–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1464614>
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., & Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(4), 225–238. <https://doi.org/10.1038/nrm3293>
- Huang, J.-Y., Hirschey, M. D., Shimazu, T., Ho, L., & Verdin, E. (2010). Mitochondrial sirtuins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, *1804*(8), 1645–1651. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.12.021>
- Huttunen, P., Hirvonen, J., & Kinnula, V. (1981). The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, *46*(4), 339–345. <https://doi.org/10.1007/BF00422121>
- Hwang, I. S. S., Fung, M. L., Liong, E. C., Tipoe, G. L., & Tang, F. (2007). Age-related changes in adrenomedullin expression and hypoxia-inducible factor-1

activity in the rat lung and their responses to hypoxia. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(1), 41–49.

Ishii, H., Oota, I., Arakawa, T., & Takuma, T. (2002). Differential gene expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors in the development of the rat masseter muscle. *Arch.Oral Biol.*, 47(7), 505.

Ishimitsu, T., Kojima, M., Kangawa, K., Hino, J., H, M., Kitamura, K., Hino, J., Matsuoka, H., Kitamura, K., Eto, T., Matsuo, H. (1994). Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203, 631–639.

Ishimitsu, T., Nishikimi, T., Saito, Y., Kitamura, K., Eto, T., Kangawa, K., Matsuo, H., Omae, T., Matsuoka, H. (1994). Plasma levels of adrenomedullin, a newly identified hypotensive peptide, in patients with hypertension and renal failure. *The Journal of Clinical Investigation*, 94(5), 2158–61.  
<https://doi.org/10.1172/JCI117573>

Jakeman, L. B., Armanini, M., Phillips, H. S., & Ferrara, N. (1993). Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology*, 133(2), 848–859.  
<https://doi.org/10.1210/endo.133.2.7688292>

Jannin, B., Menzel, M., Berlot, J.-P., Delmas, D., Lançon, A., & Latruffe, N. (2004). Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1113–1118. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.04.028>

Jansson, P.-A. (2007). Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *Journal of Internal Medicine*, 262(2), 173–183.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01830.x>

Jeltsch, M., Kaipainen, A., Joukov, V., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H., Swartz, M., Fukumura, D., Jain, R. K., Alitalo, K. (1997). Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5317), 1423–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9162011>



- Jocken, J. W. E., & Blaak, E. E. (2008). Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiology and Behavior*, *94*(2), 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.01.002>
- Jougasaki, M., & Burnett, J. C. (2000). Adrenomedullin as a renal regulator peptide. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *15*(3), 293–295. <https://doi.org/10.1093/ndt/15.3.293>
- Jougasaki, M., Wei, C. M., Aarhus, L. L., Heublein, D. M., Sandberg, S. M., & Burnett, J. C. (1995). Renal localization and actions of adrenomedullin: a natriuretic peptide. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, *268*(4). Retrieved from <http://ajprenal.physiology.org/content/268/4/F657>
- Juan, M. E., Vinardell, M. P., & Planas, J. M. (2002). The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *The Journal of Nutrition*, *132*(2), 257–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11823587>
- Kabon, B., Nagele, A., Reddy, D., Eagon, C., Fleshman, J. W., Sessler, D. I., & Kurz, A. (2004). Obesity decreases perioperative tissue oxygenation. *Anesthesiology*, *100*(2), 274–80. <https://doi.org/10.1097/01.sa.0000144258.38981.73>
- Kajimura, S., & Saito, M. (2014). A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. *Annual Review of Physiology*, *76*, 225–249. <https://doi.org/10.7589/2012-06-150>
- Kajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J. V., Gygi, S. P., & Spiegelman, B. M. (2009). Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16–C/EBP- $\beta$  transcriptional complex. *Nature*, *460*(7259), 1154–1158. <https://doi.org/10.1038/nature08262>
- Kajimura, S., Seale, P., & Spiegelman, B. M. (2010). Transcriptional Control of Brown Fat Development. *Cell Metabolism*, *11*(4), 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.005>
- Kapas, S., Catt, K. J., & Clark, A. J. (1995). Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor. *J Biol Chem*, *270*, 25344–25347.

- Kato, J., Kitamura, K., Uemura, T., Kuwasako, K., Kita, T., Kangawa, K., & Eto, T. (2002). Plasma levels of adrenomedullin and atrial and brain natriuretic peptides in the general population: their relations to age and pulse pressure. *Hypertension Research: Official Journal of the Japanese Society of Hypertension*, 25(6), 887–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12484513>
- Kelly, G. (2010). A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 15(3), 245–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21155626>
- Kelly, G. S. (2010). A Review of the Sirtuin System, its Clinical Implications, and the Potential Role of Dietary Activators like Resveratrol: Part 2. *Amr 313 Alternative Medicine Review*, 15(4), 313–328. Retrieved from <http://www.altmedrev.com/publications/15/4/313.pdf>
- Kitamura, K., Ichiki, Y., Tanaka, M., Kawamoto, M., Emura, J., Sakakibara, S., Kangawa, K., Matsuo, H., Eto, T. (1994). Immunoreactive adrenomedullin in human plasma. *FEBS Letters*, 341(2–3), 288–290. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80474-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80474-5)
- Kitamura, K., Kangawa, K., Kawamoto, M., Ichiki, Y., Nakamura, S., Matsuo, H., & Eto, T. (1993). Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 192(2), 553–60. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1451>
- Kitamura, K., Kato, J., Kawamoto, M., Tanaka, M., Chino, N., Kangawa, K., & Eto, T. (1998). The intermediate form of glycine-extended adrenomedullin is the major circulating molecular form in human plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244, 551–555.
- Kitamura, K., Sakata, J., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., & Eto, T. (1993). Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 194, 720–725.
- Knerr, I., Schirl, C., Horbach, T., Stuppy, A., Carbon, R., Rascher, W., & Dötsch, J. (2005). Maturation of the expression of adrenomedullin, endothelin-1 and nitric oxide synthases in adipose tissues from childhood to adulthood. *International*

*Journal of Obesity*, 29(3), 275–280. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802885>

- Koh, Y. J., Park, B.-H., Park, J.-H., Han, J., Lee, I.-K., Park, J. W., & Koh, G. Y. (2009). Activation of PPAR $\gamma$  induces profound multilocularization of adipocytes in adult mouse white adipose tissues. *Experimental and Molecular Medicine*, 41(12), 880. <https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.12.094>
- Kohno, M., Hanehira, T., Kano, H., Horio, T., Yokokawa, K., Ikeda, M., Minami, M., Yasunari, K., Yoshikawa, J. (1996). Plasma adrenomedullin concentrations in essential hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 27(1), 102–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8591870>
- Koo, D. J., Zhou, M., Chaudry, I. H., & Wang, P. (2001). The Role of Adrenomedullin in Producing Differential Hemodynamic Responses during Sepsis, 218, 207–218. <https://doi.org/10.1006/jsre.2000.6013>
- Krauss, S., Zhang, C.-Y., & Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3), 248–261. <https://doi.org/10.1038/nrm1592>
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M, Puigserver, P., Auwerx, J. (2006). Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell*, 127(6), 1109–1122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.013>
- Lamallice, L., Le Boeuf, F., & Huot, J. (2007). Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circulation Research*, 100(6). Retrieved from <http://circres.ahajournals.org/content/100/6/782>
- Langcake, P., & Pryce, R. J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9(1), 77–86. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(76\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0048-4059(76)90077-1)
- Langin, D. (2006). Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *Comptes Rendus - Biologies*, 329(8), 598–607. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.10.008>

- Ledoux, S., Queguiner, I., Msika, S., Rufat, P., Gasc, J.-M., Corvol, P., & Larger, E. (2008). Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue. *Accepted for Publication, Diabetes*, 57(DECEMBER), 3247–3257. <https://doi.org/10.2337/db07-1812>.
- Lee, Y.-H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2012). In Vivo Identification of Bipotential Adipocyte Progenitors Recruited by  $\beta$ 3-Adrenoceptor Activation and High-Fat Feeding. *Cell Metabolism*, 15(4), 480–491. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.009>
- Li, S., Huang, N. F., & Hsu, S. (2005). Mechanotransduction in endothelial cell migration. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(6), 1110–1126. <https://doi.org/10.1002/jcb.20614>
- Li, Y.-Y., Hwang, I. S.-S., O, W.-S., & Tang, F. (2006). Adrenomedullin peptide: gene expression of adrenomedullin, its receptors and receptor activity modifying proteins, and receptor binding in rat testis--actions on testosterone secretion. *Biology of Reproduction*, 75(2), 183–188. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.052274>
- Li, Y., Jiang, C., Wang, X., Zhang, Y., Shibahara, S., & Takahashi, K. (2007). Adrenomedullin is a novel adipokine: Adrenomedullin in adipocytes and adipose tissues, 28, 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.03.005>
- Li, Y., Totsune, K., Takeda, K., Furuyama, K., Shibahara, S., & Takahashi, K. (2003). Differential expression of adrenomedullin and resistin in 3T3-L1 adipocytes treated with tumor necrosis factor-alpha. *European Journal of Endocrinology*, 149(3), 231–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12943526>
- Li, Y., Zhang, Y., Furuyama, K., Yokoyama, S., Takeda, K., Shibahara, S., & Takahashi, K. (2006). Identification of adipocyte differentiation-related regulatory element for adrenomedullin gene repression (ADRE-AR) in 3T3-L1 cells. *Peptides*, 27(6), 1405–1414. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.11.009>
- Lobov, I. B., Brooks, P. C., & Lang, R. A. (2002). Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 11205–11210.

<https://doi.org/10.1073/pnas.172161899>

- Longo, V. D., & Kennedy, B. K. (2006). Sirtuins in Aging and Age-Related Disease. *Cell*, *126*(2), 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.002>
- López-Nicolás, J. M., & García-Carmona, F. (2008). Aggregation State and  $pK_a$  Values of (E)-Resveratrol As Determined by Fluorescence Spectroscopy and UV–Visible Absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(17), 7600–7605. <https://doi.org/10.1021/jf800843e>
- Lyttle, D. J., Fraser, K. M., Fleming, S. B., Mercer, A. A., & Robinson, A. J. (1994). Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *Journal of Virology*, *68*(1), 84–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8254780>
- Marambaud, P., Zhao, H., & Davies, P. (2005). Resveratrol Promotes Clearance of Alzheimer's Disease Amyloid- $\beta$  Peptides. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(45), 37377–37382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508246200>
- Martínez, V., Cuttitta, F., & Taché, Y. (1997). Central Action of Adrenomedullin to Inhibit Gastric Emptying in Rats. *Endocrinology*, *138*(9), 3749–3755. <https://doi.org/10.1210/endo.138.9.5397>
- Martínez-Álvarez, R. M., Volkoff, H., Muñoz-Cueto, J. A., & Delgado, M. J. (2009). Effect of calcitonin gene-related peptide (CGRP), adrenomedullin and adrenomedullin-2/intermedin on food intake in goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides*, *30*(4), 803–807. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.12.015>
- Martinez, A., Hodge, D., Garayoa, M., Young, H., & Cuttitta, F. (2001). Alternative splicing of the proadrenomedullin gene results in differential expression of gene products. *Journal of Molecular Endocrinology*, *27*, 31–41.
- Martinez, A., Miller, M. J., Unsworth, E. J., Siegfried, J. M., & Cuttitta, F. (1995). Expression of adrenomedullin in normal human lung and in pulmonary tumors. *Endocrinology*, *136*(9), 4099–4105. <https://doi.org/10.1210/endo.136.9.7649118>
- Meeran, K., O'Shea, D., Upton, P. D., Small, C. J., Ghatei, M. A., Byfield, P. H., & Bloom, S. R. (1997). Circulating Adrenomedullin Does Not Regulate Systemic Blood Pressure but Increases Plasma Prolactin after Intravenous Infusion in Humans: A Pharmacokinetic Study. *The Journal of Clinical Endocrinology &*

*Metabolism*, 82(1), 95–100. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.1.3656>

- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Büttner, M., Rziha, H. J., Dehio, C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *The EMBO Journal*, 18(2), 363–74. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.2.363>
- Miao, C.-Y., & Li, Z.-Y. (2012). The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *British Journal of Pharmacology*, 165(3), 643–658. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01404.x>
- Michishita, E., Park, J. Y., Burneskis, J. M., Barrett, J. C., & Horikawa, I. (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10), 4623–35. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-01-0033>
- Minami, J., Nishikimi, T., Ishimitsu, T., Makino, Y., Kawano, Y., Takishita, S., Kangawa, K., Matsuoka, H. (2000). Effect of a hypocaloric diet on adrenomedullin and natriuretic peptides in obese patients with essential hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 36 Suppl 2, S83-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11206728>
- Moore, R. L., Dai, Y., & Faller, D. V. (2012). Sirtuin 1 (SIRT1) and steroid hormone receptor activity in cancer. *The Journal of Endocrinology*, 213(1), 37–48. <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0217>
- Mould, A. W., Tonks, I. D., Cahill, M. M., Pettit, A. R., Thomas, R., Hayward, N. K., & Kay, G. F. (2003). Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 48(9), 2660–2669. <https://doi.org/10.1002/art.11232>
- Muff, R., Born, W., & Fischer, J. A. (2003). Adrenomedullin Selectivity of Calcitonin-like Receptor / Receptor Activity Modifying Proteins. *Hypertension Research*, 26(Suppl), 3–8.
- Mulder, H., Ahrén, B., Karlsson, S., & Sundler, F. (1996). Adrenomedullin: localization in the gastrointestinal tract and effects on insulin secretion.

*Regulatory Peptides*, 62(2), 107–112. [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(96\)00005-5](https://doi.org/10.1016/0167-0115(96)00005-5)

Murphy, T. C., & Samson, W. K. (1995). The novel vasoactive hormone, adrenomedullin, inhibits water drinking in the rat. *Endocrinology*, 136(6), 2459–2463. <https://doi.org/10.1210/endo.136.6.7750467>

Nakamura, M., Han, B., Nunobiki, O., & Kakudo, K. (2006). Adrenomedullin: A Tumor Progression Factor via Angiogenic Control, 635–643.

Nambu, T., Arai, H., Komatsu, Y., Yasoda, A., Moriyama, K., Kanamoto, N., ... Nakao, K. (2005). Expression of the adrenomedullin gene in adipose tissue. *Regulatory Peptides*, 132(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2005.07.006>

NCBI genome browser. (a).

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=309757](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=309757). Retrieved from

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=309757](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=309757)

NCBI genome browser. (b). Vegfa vascular endothelial growth factor A [ *Rattus norvegicus* (Norway rat) ].

Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/83785>

Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 293(2). Retrieved from <http://ajpendo.physiology.org/content/293/2/E444.short>

Nikitenko, L. L., Fox, S. B., Kehoe, S., Rees, M. C. P., & Bicknell, R. (2006). Adrenomedullin and tumour angiogenesis. *British Journal of Cancer*, 94(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602832>

Nomura, I., Kato, J., Tokashiki, M., & Kitamura, K. (2009). Increased plasma levels of the mature and intermediate forms of adrenomedullin in obesity. *Regulatory Peptides*, 158(1–3), 127–131. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.08.003>

Nussdorfer, G. G., Rossi, G. P., & Mazzocchi, G. (1997). Role of Adrenomedullin and Related Peptides in the Regulation of the Hypothalamo – Pituitary –

Adrenal Axis, 18(7), 1079–1089.

- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88(2), 277–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9008168>
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., Folkman, J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79(2), 315–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525077>
- Oberkofler, H., Dallinger, G., Liu, Y. M., Hell, E., Krempler, F., & Patsch, W. (1997). Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *Journal of Lipid Research*, 38(10), 2125–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9374134>
- Ohinata, K., Inui, A., Asakawa, A., & Yoshikawa, M. (2001). Novel actions of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP). *Peptides*, 22(11), 1809–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754967>
- Oya, H., Nagaya, N., Furuichi, S., Nishikimi, T., Ueno, K., Nakanishi, N., Yamagishi, M., Kangawa, K., Miyatake, K., Kangawa, K., Matsuo, H., Omae, M., Matsuo, H., Kangawa, K. (2000). Comparison of intravenous adrenomedullin with atrial natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *The American Journal of Cardiology*, 86(1), 94–8. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(00\)00836-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(00)00836-5)
- Papetti, M., & Herman, I. M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *AJP: Cell Physiology*, 282(5), C947–C970. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00389.2001>
- Parker, M. G., Christian, M., & White, R. (2006). The nuclear receptor co-repressor RIP140 controls the expression of metabolic gene networks. *Biochemical Society Transactions*, 34(6). Retrieved from <http://www.biochemsoctrans.org/content/34/6/1103>
- Parkes, D. G., & May, C. N. (1995). ACTH-Suppressive and Vasodilator Actions of Adrenomedullin in Conscious Sheep. *Journal of Neuroendocrinology*, 7(12),



923–929. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1995.tb00737.x>

- Paulmyer-Lacroix, O., Desbriere, R., Poggi, M., Achard, V., Alessi, M.-C., Boudouresque, F., Ouafik, L'H, Vuaroqueaux, V., Labuhn, M., Dutourand, A., Grino, M. (2006). Expression of adrenomedullin in adipose tissue of lean and obese women. *European Journal of Endocrinology*, *155*(1), 177–85. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02170>
- Paweletz, N., & Knierim, M. (1989). Tumor-related angiogenesis. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, *9*(3), 197–242. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2480145>
- Pedersen, S. B., Ølholm, J., Paulsen, S. K., Bennetzen, M. F., & Richelsen, B. (2008). Low Sirt1 expression, which is upregulated by fasting, in human adipose tissue from obese women. *International Journal of Obesity (2005)*, *32*(8), 1250–5. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.78>
- Peeters, A. V., Beckers, S., Verrijken, A., Mertens, I., Roevens, P., Peeters, P. J., Van Hul, W., Van Gaal, L. F. (2008). Association of SIRT1 gene variation with visceral obesity. *Human Genetics*, *124*(4), 431–436. <https://doi.org/10.1007/s00439-008-0567-8>
- Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado de Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M. W., Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- $\gamma$ . *Nature*, *429*(6993), 771–776. <https://doi.org/10.1038/nature02583>
- Plank, M. J., & Sleeman, B. D. (2003). Tumour-Induced Angiogenesis: A Review. *Journal of Theoretical Medicine*, *5*(3–4), 137–153. <https://doi.org/10.1080/10273360410001700843>
- Potente, M., Gerhardt, H., & Carmeliet, P. (2011). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell*, *146*(6), 873–887. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>
- Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., & Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *16*(2), 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.004>

- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., Spiegelman, B. M., Corden, J. L., Dauca, M., Samarut, J., Ghysdael, J., Cabello, G. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829–39. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81410-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81410-5)
- Qiao, L., & Shao, J. (2006). SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 39915–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607215200>
- Rayalam, S., Yang, J.-Y., Ambati, S., Della-Fera, M. A., & Clifton, A. B. (2008). Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytotherapy Research*, 22, 1367–1371.
- Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet (London, England)*, 339(8808), 1523–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1351198>
- Reynolds, L. P., Grazul-Bilska, A. T., & Redmer, D. A. (2000). Angiogenesis in the Corpus Luteum. *Endocrine*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1385/ENDO:12:1:1>
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671–674. <https://doi.org/10.1038/386671a0>
- Robinson, C. J., & Stringer, S. E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 5), 853–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181169>
- Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., & Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature*, 434(7029), 113–118. <https://doi.org/10.1038/nature03354>
- Rodríguez, R. Á., Lahoz, I. R., Faza, O. N., Cid, M. M., & Lopez, C. S. (2012). Theoretical and experimental exploration of the photochemistry of resveratrol: beyond the simple double bond isomerization. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10(46), 9175. <https://doi.org/10.1039/c2ob26241j>
- Rosen, E. D., & MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(12), 885–896. <https://doi.org/10.1038/nrm2066>

- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, *444*(7121), 847–853. <https://doi.org/10.1038/nature05483>
- Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T., & Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology*, *15*(6), 659–667. <https://doi.org/10.1038/ncb2740>
- Rossowski, W. J., Jiang, N.-Y., & Coy, D. H. (1997). Adrenomedullin, amylin, calcitonin gene-related peptide and their fragments are potent inhibitors of gastric acid secretion in rats. *European Journal of Pharmacology*, *336*(1), 51–63. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01252-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01252-1)
- Roupe, K. A., Remsberg, C. M., Yáñez, J. A., & Davies, N. M. (2006). Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. *Current Clinical Pharmacology*, *1*(1), 81–101.  
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18666380>
- Rupnick, M. A., Panigrahy, D., Zhang, C.-Y., Dallabrida, S. M., Lowell, B. B., Langer, R., & Folkman, M. J. (2002). Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(16), 10730–10735. <https://doi.org/10.1073/pnas.162349799>
- Sainson, R. C. A., Aoto, J., Nakatsu, M. N., Holderfield, M., Conn, E., Koller, E., & Hughes, C. C. W. (2005). Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis. *The FASEB Journal*, *19*(8), 1027–9. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3172fje>
- Sakata, J., Shimokubo, T., Kitamura, K., Nakamura, S., Kangawa, K., Matsuo, H., & Eto, T. (1993). Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *195*, 921–927.
- Samson, W. K. (1999). Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu Rev Physiol*, *61*, 363–389.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.61.1.363>
- Samson, W. K., & Murphy, T. C. (1997). Adrenomedullin Inhibits Salt Appetite. *Endocrinology*, *138*(2), 613–616. <https://doi.org/10.1210/endo.138.2.4943>

- Samson, W. K., Murphy, T. C., & Resch, Z. T. (1998). Central mechanisms for the hypertensive effects of preproadrenomedullin-derived peptides in conscious rats. *The American Journal of Physiology*, *274*(5 Pt 2), R1505-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612421>
- Sato, K., Hirata, Y., Imai, T., Iwashina, M., & Marumo, F. (1995). Characterization of immunoreactive adrenomedullin in human plasma and urine. *Life Sciences*, *57*(2), 189–194. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)00259-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)00259-9)
- Satoh, F., Takahashi, K., Murakami, O., Totsune, K., Sone, M., Ohneda, M., Abe, K., Miura, Y., Hayashi, Y., Sasano, H. (1995). Adrenomedullin in human brain, adrenal glands and tumor tissues of pheochromocytoma, ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *80*(5), 1750–1752. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.5.7745031>
- Saunders, L. R., & Verdin, E. (2007). Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, *26*(37), 5489–5504. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210616>
- Schröder, G., Brown, J. W., & Schröder, J. (1988). Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *European Journal of Biochemistry*, *172*(1), 161–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450022>
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Seeley, R. J., Barsh, G. S., Baskin, D. G., & Leibel, R. L. (2003). Is the Energy Homeostasis System Inherently Biased Toward Weight Gain? *Diabetes*, *52*(2). Retrieved from <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/52/2/232>
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M. A., Beier, D. R., Spiegelman, B. M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, *454*(7207), 961–967. <https://doi.org/10.1038/nature07182>
- Seale, P., & Lazar, M. A. (2009). Brown fat in humans: Turning up the heat on obesity. *Diabetes*, *58*(7), 1482–1484. <https://doi.org/10.2337/db09-0622>
- Shibasaki, I., Nishikimi, T., Mochizuki, Y., Yamada, Y., Yoshitatsu, M., Inoue, Y., Kuwata, T., Ogawa, H., Tsuchiya, G., Ishimitsu, T., Fukuda, H. (2010). Greater

- expression of inflammatory cytokines, adrenomedullin, and natriuretic peptide receptor-C in epicardial adipose tissue in coronary artery disease. *Regulatory Peptides*, 165(2–3), 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.07.169>
- Shimekake, Y., Nagata, K., Ohta, S., Kambayashi, Y., Teraoka, H., Kitamura, K., Eto, T., Kangawa, K., Matsuo, H. (1995). Adrenomedullin stimulated two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca<sup>2+</sup> mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 4412–4417.
- Shimokubo, T., Sakata, J., Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H., & Eto, T. (1995). Augmented adrenomedullin concentrations in right ventricle and plasma of experimental pulmonary hypertension. *Life Sciences*, 57(19), 1771–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7475919>
- Shinomiya, K., Ohmori, K., Ohyama, H., Hosomi, N., Takahashi, T., Osaka, K., & Kohno, M. (2001). Association of plasma adrenomedullin with carotid atherosclerosis in chronic ischemic stroke. *Peptides*, 22(11), 1873–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754975>
- Sielmann, E. H., & Creasy, L. L. (1992). Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43(1), 49–52.
- Silins, G., Grimmond, S., Egerton, M., & Hayward, N. (1997). Analysis of the Promoter Region of the Human VEGF-Related Factor Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 230(2), 413–418. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.5979>
- Simons, M., Gordon, E., & Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(10), 611–625. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.87>
- Stefl, B., Janovská, A., Hodný, Z., Rossmeisl, M., Horáková, M., Syrový, I., Bémová, J., Kopecký, J., Kopecký, J. (1998). Brown fat is essential for cold-induced thermogenesis but not for obesity resistance in aP2-Ucp mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 274(3). Retrieved from <http://ajpendo.physiology.org/content/274/3/E527.long>
- Storkebaum, E., Lambrechts, D., & Carmeliet, P. (2004). VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *BioEssays*, 26(9), 943–954. <https://doi.org/10.1002/bies.20092>

- Stuttfeld, E., & Ballmer-Hofer, K. (2009). Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*, *61*(9), 915–922. <https://doi.org/10.1002/iub.234>
- Su, J.-L., Yang, C.-Y., Zhao, M., Kuo, M.-L., & Yen, M.-L. (2007). Forkhead Proteins Are Critical for Bone Morphogenetic Protein-2 Regulation and Anti-tumor Activity of Resveratrol. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(27), 19385–19398. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702452200>
- Sugo, S., Minamino, N., Shoji, H., Kangawa, K., Kitamura, K., Eto, T., & Matsuo, H. (1995). Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor and Lipopolysaccharide Additively Stimulate Production of Adrenomedullin in Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *207*(1), 25–32. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1148>
- Swiss-model. SWISS-MODEL | Q96EB6. Retrieved June 3, 2017, from <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q96EB6?csm=2D3BEA6D73DA229F>
- Szabo, G. (2009). A glass of red wine to improve mitochondrial biogenesis? Novel mechanisms of resveratrol. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, *297*(1), H8–H9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00471.2009>
- Takahashi, K., Totsune, K., Sone, M., Kikuchi, K., & Murakami, O. (2005). Effects of adipokines on expression of adrenomedullin and endothelin-1 in cultured vascular endothelial cells. *Peptides*, *26*(5), 845–851. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.12.007>
- Tang, B. L. (2010). Resveratrol is neuroprotective because it is not a direct activator of Sirt1—A hypothesis. *Brain Research Bulletin*, *81*(4–5), 359–361. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.12.007>
- Thakran, S., Sharma, P., Attia, R. R., Hori, R. T., Deng, X., Elam, M. B., & Park, E. A. (2013). Role of sirtuin 1 in the regulation of hepatic gene expression by thyroid hormone. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(2), 807–818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.437970>
- Thurston, G., Noguera-Troise, I., & Yancopoulos, G. D. (2007). The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, *7*(5), 327–331. <https://doi.org/10.1038/nrc2130>

- Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., & Langin, D. (2003). Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 33370–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305235200>
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., & Abraham, J. A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(18), 11947–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1711045>
- Toseland, C. D., Campbell, S., Francis, I., Bugelski, P. J., & Mehdi, N. (2001). Comparison of adipose tissue changes following administration of rosiglitazone in the dog and rat. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 3(3), 163–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11412280>
- Tredici, G., Miloso, M., Nicolini, G., Galbiati, S., Cavaletti, G., & Bertelli, A. (1999). Resveratrol, map kinases and neuronal cells: might wine be a neuroprotectant? *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 25(2–3), 99–103. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10370870>
- Um, J.-H., Park, S.-J., Kang, H., Yang, S., Foretz, M., McBurney, M. W., Kim, M. K., Viollet, B., Chung, J. H. (2010). AMP-Activated Protein Kinase–Deficient Mice Are Resistant to the Metabolic Effects of Resveratrol. *Diabetes*, 59(3). Retrieved from <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/59/3/554.long>
- UniProt.. Retrieved from <http://www.uniprot.org/uniprot/P15692>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., & Teule, G. J. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *New Eng J Med.*, 360, 1500–1508.
- Veikkola, T., Karkkainen, M., Claesson-Welsh, L., & Alitalo, K. (2000). Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Research*, 60(2), 203–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10667560>

- Villarroya, F., Domingo, P., & Giralt, M. (2005). Lipodystrophy associated with highly active anti-retroviral therapy for HIV infection: The adipocyte as a target of anti-retroviral-induced mitochondrial toxicity. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(2), 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.12.005>
- Vinciguerra, M., Fulco, M., Ladurner, A., Sartorelli, V., & Rosenthal, N. (2010). SirT1 in muscle physiology and disease: lessons from mouse models. *Disease Models & Mechanisms*, 3(5–6). Retrieved from <http://dmm.biologists.org/content/3/5-6/298.short>
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E., & Walle, U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(12), 1377–1382. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000885>
- Watanabe, M., Yamamoto, T., Mori, C., Okada, N., Yamazaki, N., Kajimoto, K., Kataoka, M., Shinohara, Y. (2008). Cold-Induced Changes in Gene Expression in Brown Adipose Tissue: Implications for the Activation of Thermogenesis. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(5), 775–784. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.775>
- Wenzel, E., Soldo, T., Erbersdobler, H., & Somoza, V. (2005). Bioactivity and metabolism of trans-resveratrol orally administered to Wistar rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(5), 482–494. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500003>
- Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M. A., Chui, P. C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M. P., Corvera, S. (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *Journal of Clinical Investigation*, 114(9), 1281–1289. <https://doi.org/10.1172/JCI21752>
- Wisse, B. E., Kim, F., & Schwartz, M. W. (2007). PHYSIOLOGY: An Integrative View of Obesity. *Science*, 318(5852), 928–929. <https://doi.org/10.1126/science.1148032>
- Xue, B., Coulter, A., Rim, J. S., Koza, R. A., & Kozak, L. P. (2005). Transcriptional synergy and the regulation of Ucp1 during brown adipocyte induction in white fat depots. *Molecular and Cellular Biology*, 25(18), 8311–22. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.18.8311-8322.2005>



- Xue, Y., Petrovic, N., Cao, R., Larsson, O., Lim, S., Chen, S., Feldmann, H. M., Liang, Z., Zhu, Z., Nedergaard, J., Cannon, B., Cao, Y. (2009). Hypoxia-Independent Angiogenesis in Adipose Tissues during Cold Acclimation. *Cell Metabolism*, 9(1), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.11.009>
- Yamaguchi, T., Baba, K., Doi, Y., Yano, K., Kitamura, K., & Eto, T. (1996). Inhibition of Aldosterone Production by Adrenomedullin, a Hypotensive Peptide, in the Rat. *Hypertension*, 28(2). Retrieved from <http://hyper.ahajournals.org/content/28/2/308.long>
- Yurekli, M., & Culum, A. A. (2016). The investigation of relationship between adrenomedullin vascular growth endothelial factor in obese and calorie restricted rats. *Medical Science and Discovery*, 3(3), 124. <https://doi.org/10.17546/msd.31121>
- Zarei, M., Khazaei, M., Sharifi, M. R., & Pourshanazari, A. A. (2011). Coronary angiogenesis during experimental hypertension: is it reversible? *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 16(3), 269–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22091243>
- Zhang, J. (2006). Resveratrol inhibits insulin responses in a SirT1-independent pathway. *Biochemical Journal*, 397(3), 519–527. <https://doi.org/10.1042/BJ20050977>
- Zhang, Q.-X., Magovern, C. J., Mack, C. A., Budenbender, K. T., Ko, W., & Rosengart, T. K. (1997). Vascular Endothelial Growth Factor Is the Major Angiogenic Factor in Omentum: Mechanism of the Omentum-Mediated Angiogenesis. *Journal of Surgical Research*, 67(2), 147–154. <https://doi.org/10.1006/jsre.1996.4983>
- Zhou, Z., Yon Toh, S., Chen, Z., Guo, K., Peng Ng, C., Ponniah, S., Lin, S-C., Hong, W., Li, P. (2003). Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nature Genetics*, 35(1), 49–56. <https://doi.org/10.1038/ng1225>
- Zudaire, E., Portal-nu, S., & Cuttitta, F. (2006). The central role of adrenomedullin in host defense. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(August), 237–244. <https://doi.org/10.1189/jlb.0206123>

Zygmunt, M., Herr, F., Münstedt, K., Lang, U., & Liang, O. D. (2003). Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, S10-8.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12965086>

## 7 EKLER

### ÖZGEÇMİŞ

- Ad Soyad** : Ayşe Asiye CULUM
- Doğum Yeri ve Tarihi** : 29.04.1977 Ankara/ TÜRKİYE
- Adres** : Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü,  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı İnönü Üniversitesi (Malatya)
- E-Posta** : [ayseasiye@hotmail.com](mailto:ayseasiye@hotmail.com)
- Lisans** : Biyoloji Bölümü, İnönü Üniversitesi, Malatya  
(1995-2010)
- Yüksek Lisans** : Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü,  
Moleküler Biyoloji Bilim Dalı, İnönü Üniversitesi, Malatya (2011-2013)  
Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İnönü  
Üniversitesi, Malatya (2013-2016)
- Mesleki Deneyim** :
- Öğretim Asistanı, Fizyoloji Laboratuvarı, Biyoloji Bölümü, İnönü Üniversitesi,  
Malatya (2013-2017)
- Laboratuar Sorumlusu, Özel EGM Hayat Hastanesi, Malatya (29.06.2006-  
31.07.2010)
- Biyolog, Özel Malatya Hastanesi, Malatya (15.09.2004-28.06.2006)
- Laboratuar Sorumlusu, Müjde Hastanesi, Malatya (01.10.2001-30.07.2004)
- Biyolog, Malatya Patoloji ve Sitoloji Laboratuvarı, Malatya (02.12.2000-  
30.09.2001)
- Biyolog, Sevgi Tıp Merkezi, Malatya (15.06.2000-01.11.2000)
- Yayın Listesi** :
- Yurekli, M., Culum, A., “The effects and angiogenic features of  
adrenomedullin in obese rats”, *The FASEB Journal*, 2015, 29:1, Supp. 884.4.
- Yurekli, M., Culum, A.A., “The investigation of relationship between  
adrenomedullin vascular growth endothelial factor in obese and calorie restricted  
rats”, *Medical Science and Discovery*, 2016, 3:3, 124-9.