

**KAS ÖZELLİKLERİ VE OBEZİTE ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
GENETİK VE BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

PROJE NO: SBAG-BMBF-6 (108S264)

Prof. Dr. Feride SEVERCAN

Prof. Dr. Nuhan PURALI

Yard. Doç. Dr. Sreeparna BANERJEE

NİSAN 2012

ANKARA

ÖNSÖZ

Berlin obez inbred yağ fareleri ve berlin inbred kas fareleri iskelet kas dokularında obeziteye bağlı moleküler düzeyde oluşan değişimlerin anlaşılması, bu dokuların makromoleküllerinde, özellikle lipit içeriğinde, oluşan yapısal, fonksiyonel ve dinamik değişimlerin tespit edilmesi, bu kaslardaki lipit çeşitleri ve dağılımlarının tayin edilmesi ve böylece bu özel hayvan modellerinin iskelet kas dokularının karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma Nisan 2009 ayında başlamış ve Nisan 2012’de bitmiştir. Proje uluslararası işbirliği çerçevesinde IntenC programı dahilinde TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu tarafından 312 960 YTL olarak desteklenmiştir (SBAG-BMBF-6, 108S264).

Prof. Dr. Feride SEVERCAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	2
TABLolar LİSTESİ	4
ŞEKİLLER LİSTESİ	6
KISALTMALAR	9
ÖZET	10
ABSTRACT	13
1. GİRİŞ	16
1.1. Çalışmanın Amacı	16
1.2. Proje Önerisinde Tanımlanan Çalışma ile Gerçekleştirilen Çalışmanın Karşılaştırılması	17
2. GENEL BİLGİLER	19
2.1. Obezite	19
2.2. İskelet kası ve insülin direnci	21
2.3. Obezite araştırmalarında kullanılan hayvan modelleri	23
2.4. Projede Kullanılan Biyofiziksel ve Biyokimyasal Teknikler	24
2.4.1. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve mikrospektroskopisi	24
2.4.2. Konfokal mikroskopisi	28
2.4.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Hayvan modelleri	32
3.2. Hayvan deneyleri	33
3.3. ATR-FTIR spektroskopisi	35
3.3.1. Spektral verilerinin toplanması	35
3.3.2. ATR-FTIR spektroskopik çalışmalarında kullanılan spektrum analiz yöntemleri	35
3.4. FTIR mikrospektroskopik çalışmaları	36
3.5. Konfokal mikroskopisi	38
3.5.1. Konfokal mikroskopisi deneyleri için gerçekleştirilen immünohistokimyasal boyamalar	38
3.5.2. Konfokal mikroskopisi veri toplanması ve analizi	40
3.6. HPLC-ELSD Çalışmaları	40
3.6.1. Lipit Ekstraksiyonu:	41
3.6.2. HPLC-ELSD Deneyleri:	42
3.7. İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	44
4.1. Fare ırklarının karakterizasyonu	44
4.1.1. Vücut ağırlıkları	44
4.1.2. Serum parametreleri ve ipITT sonuçları	45
4.2. ATR-FTIR Spektroskopisi Çalışmaları	49
4.3. Görüntüleme teknikleri ile yapılan çalışmalar	74
4.3.1. FTIR mikrospektroskopisi çalışmaları	74
4.3.2. Konfokal mikroskopisi çalışmaları	84
5. HPLC-ELSD ÇALIŞMALARI	89
6. SONUÇLAR	110
KAYNAKÇA	114
EKLER	127

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Spektral haritalarda gerçekleştirilen bant alanı hesaplamaları için kullanılan bölgeler.....	37
Tablo 2. Spektral haritalarda görüntülenen bant alan oranları	37
Tablo 3. HPLC deneylerinde kullanılan mobil fazların akış hızı ve zamana bağlı gradyanları.....	43
Tablo 4. İskelet kas dokusunun IR spektrumundaki başlıca soğurmalar (RIGAS v.d., 1990; WONG v.d., 1991; TAKAHASHI v.d., 1991; JACKSON v.d., 1998; LYMAN v.d., 1999; MELIN v.d., 2000; CAKMAK v.d., 2006; TOYRAN v.d., 2006; OZEK v.d., 2009; OZEK v.d., 2010; BOZKURT v.d. 2010).....	50
Tablo 5. SBD ile beslenmiş kontrol ve BMMI fare hatları LD iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ olarak ifade edilmiştir.	54
Tablo 6. SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI fare hatları LD iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ olarak ifade edilmiştir.	55
Tablo 7. SBD ile beslenmiş kontrol ve BMMI fare hatları Q iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ olarak ifade edilmiştir.	56
Tablo 8. SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI fare hatları Q iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların alan değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ olarak ifade edilmiştir.	57
Tablo 9. SBD ile beslenmiş kontrol ve BMMI fare hatları LD iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların frekans değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ olarak ifade edilmiştir.	58
Tablo 10. SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI fare hatları LD iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların frekans değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ olarak ifade edilmiştir.	59
Tablo 11. SBD ile beslenmiş kontrol ve BMMI fare hatları Q iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların frekans değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ olarak ifade edilmiştir.	60
Tablo 12. SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI fare hatları Q iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların frekans değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına	

göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p < 0.05$,
** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak ifade edilmiştir.61
Tablo 13. HPLC-ELSD deneylerinde kullanılan standart lipidlerin tutulma süreleri90

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Çok yansımali ATR sistemi yapısı.....	26
Şekil 2. FTIR mikrospektroskobu çalışma prensibi	27
Şekil 3. Konfokal mikroskop çalışma prensibi	30
Şekil 4. ELS dedektörlerinin çalışma prensibi (http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/19182-Optimizing-the-Sensitivity-of-an-Evaporative-Light-Scattering-Detector/).....	31
Şekil 5. Atmosferik havanın 4000-650 cm^{-1} bölgesindeki ATR-FTIR spektrumu.	35
Şekil 6. 20 haftalık A) SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI farelerinin, B) SBD verilmiş kontrol, SBD verilmiş BFMI ve HFD verilmiş BFMI farelerinin değişik günlerde ölçülmüş vücut ağırlığı değişimleri.	45
Şekil 7. 20 haftalık fareler 2 saat aç bırakıldıktan sonra toplanan kan örneklerinden elde edilen serum içeriğindeki A) kan şekeri (mg/dl), B) insülin (pg/dl), C) leptin (pg/dl), D) adiponektin (pg/dl), E) trigliserit (TG, mg/dl) ve F) esterifiye olmamış yağ asidi (NEFA, mmol/l) miktarlarındaki değişimler. Kontrol ve BMM ırkları sadece SBD ile beslenmiş, BFMI ırkları ise hem SBD hem HFD ile beslenmiştir.	46
Şekil 8. A) 10 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI farelerinin, B) 10 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol, SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI farelerinin, C) 20 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI farelerinin, D) 20 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol, SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI farelerinin ipITT testi sonuçları.	48
Şekil 9. 4000-900 cm^{-1} aralığında kayıt edilen örnek iskelet kas dokusu spektrumu.....	49
Şekil 10. SBD ile beslenmiş kontrol DBA/2J, BMMI806, BFMI860 ve HFD ile beslenmiş BFMI860 fare ırkları LD kas dokularına ait 3025-2800 cm^{-1} frekans aralığında CH_3 antisimetrik gerilim bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.....	51
Şekil 11. SBD ile beslenmiş kontrol DBA/2J, BMMI806, BFMI860 ve HFD ile beslenmiş BFMI860 fare ırkları Q kas dokularına ait 3025-2800 cm^{-1} frekans aralığında CH_3 antisimetrik gerilim bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.....	51
Şekil 12. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında A) total lipit miktarında, B) lipit içeriğindeki metil grubu dağılımında (CH_3 antisimetrik gerilim bant alanı/total lipit), C) lipit içeriğindeki metilen grubu dağılımında (CH_2 antisimetrik gerilim bant alanı/total lipit) olan farklılıkları gösteren bar diagramları (Verilen değer DBA/2J ırkına göre anlamlı ise *, C57BL/6J ırkına göre anlamlı ise # işareti ile gösterilmiştir).	53
Şekil 13. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında doymamış/doymuş lipit oranında olan farklılıkları gösteren bar diagramları.	62
Şekil 14. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında hidrokarbon zincir uzunluğundaki farklılıkları (CH_2 antisimetrik gerilim bant alanı/ CH_3 antisimetrik gerilim bant alanı) gösteren bar diagramları.	64
Şekil 15. SBD ile beslenmiş kontrol DBA/2J, BMMI806, BFMI860 ve HFD ile beslenmiş BFMI860 fare ırkları LD kas dokularına ait 1800-1000 cm^{-1} frekans aralığında Amid I bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.	66
Şekil 16. SBD ile beslenmiş kontrol DBA/2J, BMMI806, BFMI860 ve HFD ile beslenmiş BFMI860 fare ırkları Q kas dokularına ait 1800-1000 cm^{-1} frekans aralığında Amid I bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.	67
Şekil 17. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında A) karbonil grubu miktarında, B) tüm lipitlerin içerisinde bulunan karbonil miktarında olan farklılıkları gösteren bar diagramları.	68
Şekil 18. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında A) total protein, B) total lipit/total protein oranında gözlenen farklılıkları gösteren bar diagramları.....	69
Şekil 19. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında A) amid I/amid II oranında, B) amidII/1343 oranında gözlenen farklılıkları gösteren bar diagramları.....	70

Şekil 20. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında A) nükleik asit/protein oranında, B) RNA/protein oranında olan farklılıkları gösteren bar diagramları.....	72
Şekil 21. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında glikojen miktarında gözlenen farklılıkları gösteren bar diagramları.....	73
Şekil 22. Örnek bir kontrol (DBA/2J) LD iskelet kası enine kesitinden FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş kesit görüntüsü (A), kırmızı ile işaretlenmiş bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (B), bu kesitin hematoksilen eozin boyamasından sonra 40X'lik objektif ile toplanan ışık mikroskobu görüntüsü (C), ve elde edilen spektral haritadan çıkarılan örnek bir iskelet kası spektrumu (D) görülmektedir.....	75
Şekil 23. Kontrol (DBA/2J) grubu LD iskelet kası enine kesitinde A) gerçekleştirilen yapısal farklılıkları çözmeye yönelik kümeleme analizi sonucu elde edilen farklı bölgeleri gösteren harita, B) bu haritadaki farklı bölgelerden çıkarılmış olan spektrumlar. Yeşil spektrum A'da tespit edilen yeşil bölgeden, kırmızı spektrum ise kırmızı bölgeden çıkarılmıştır.....	76
Şekil 24. Kontrol (DBA/2J) grubu A) LD kası, B) Q kası enine kesitlerinden FTIR mikrospektroskopisi ile toplanan spektral haritalardan hesaplanan lipit/protein (CH/amid I), lipit içeriğindeki metilen grubu dağılımı (CH ₂ antisimetrik gerilim/CH), lipit içeriğindeki metil grubu dağılımı (CH ₃ antisimetrik gerilim/CH), lipitlerin hidrokarbon zincir uzunluğu dağılımı (CH ₂ antisimetrik gerilim/CH ₃ antisimetrik gerilim), lipitlerdeki karbonil grubu dağılımı (C=O simetrik gerilim/CH), doymamış/doymuş lipitlerin dağılımı (olefinik/CH ₂ antisimetrik gerilim) ve kesitlerdeki glikojen (glikojen/1240 cm ⁻¹) dağılımlarının örnek görüntüleri. Şekillerde kırmızı daire ile belirlenmiş kas lifinde bu alan oranlarının değişimi izlenebilmektedir.....	77
Şekil 25. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki lipit/protein değerinin değişimlerini gösteren örnek haritalar.....	78
Şekil 26. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki CH ₂ antisimetrik gerilim bant alanı/CH toplam alanı değerinin değişimlerini gösteren örnek haritalar.....	79
Şekil 27. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki CH ₃ antisimetrik gerilim bant alanı/CH toplam alanı değerinin değişimlerini gösteren örnek haritalar.....	80
Şekil 28. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki CH ₂ antisimetrik gerilim bant alanı/CH ₃ antisimetrik gerilim bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.....	81
Şekil 29. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki olefinik bant alanı/ CH ₂ antisimetrik bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.....	82
Şekil 30. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki C=O ester bant alanı/ CH toplam alanı oranı değişimlerini gösteren örnek haritalar.....	83
Şekil 31. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki glikojen bant alanı/ 1240 cm ⁻¹ bant alanı değerinin değişimlerini gösteren örnek haritalar.....	84
Şekil 32. 6 mikron kalınlığındaki kontrol (DBA/2J) LD iskelet kas dokusu enine kesitlerinin LD540 boyası ve tip Ila kas liflerini boyayan MHC Ila antibodisi ile boyamasından sonra A) 488 nm dalga boyunda Argon lazerle (tip Ila kas lifleri görülmektedir), B) 543 nm dalga boyunda Helyum-Neon lazerle (lipit damlacıkları görülmektedir) illümine edilmesi sonucunda 40X'lik objektif kullanılarak elde edilen örnek konfokal mikroskopi görüntüleri ve C) 543 nm dalga boyunda toplanan görüntü içerisindeki boyanan lipit damlacıklarının özel analiz programı ile hesaplanmış örnek görüntüsü.....	86
Şekil 33. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), SBD veya HFD ile beslenmiş BFMI fareleri A) longissimus dorsi ve B) kuadriseps iskelet kası kesitlerinden elde edilen tip Ila, Iİb ve ara tip (intermediate) kas liflerine ait lipit damlacıkları toplam alanının hesaplama yapılan toplam kas lifi alanına bölünmesi ile elde edilen lipit dağılım grafikleri.....	87

Şekil 34. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), SBD veya HFD ile beslenmiş BFMI fareleri A) longissimus dorsi ve B) kuadriseps iskelet kası kesitlerinden elde edilen tip IIa, IIb ve ara tip (intermediate) kas liflerine ait lipit damlacıkları toplam sayısının hesaplama yapılan toplam kas lifi alanına bölünmesi ile elde edilen lipit dağılım grafikleri.	88
Şekil 35. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J) ve BMMI fareleri LD (A,C) ve Q (B, D) iskelet kasları tip IIa, IIb ve ara tip (intermediate) kas liflerine ait iskelet kası kesitlerinden elde edilen lipit damlacıklarının toplam alanının hesaplama yapılan toplam kas lifi alanına bölünmesi ile (A, B) ve lipit damlacıklarının toplam sayısının hesaplama yapılan toplam kas lifi alanına bölünmesi ile (C,D) elde edilen lipit dağılım grafikleri.	89
Şekil 36. Standart lipitlerin HPLC-ELSD kromatogram sonuçları. A) Kolesterol oleat (CO), B) Gliseril trioleat (TG), C) Kolesterol (C), D) 1-oleoil-rak-gliserol (MG), E) Kardiyolipin (CLPN), F) Fosfatidilkolin (PC).	93
Şekil 37. Deneylerde kullanılan her bir standart lipit için elde edilen kalibrasyon eğrileri. A) Kolesterol oleat (CO), B) Gliseril trioleat (TG), C) Kolesterol (C), D) 1-oleoil-rak-gliserol (MG), E) Fosfatidilkolin (PC), ve F) Kardiyolipin (CLPN). Kırmızı kareler, HPLC’ de yürütülen standartların konsantrasyonlarının alanlarını göstermektedir. Her bir standartın belirleme katsayısı (R2) bulunmuştur.	96
Şekil 38. C57BL/6J kontrol ırkının Q kas dokusunda bulunan HPLC-ELSD kromatogram sonucu. ..	97
Şekil 39. LD kas dokusundan elde edilen lipitlerin DBA/2J, BFMI860 ve BFMI861 fare ırklarında karşılaştırmalı HPLC-ELSD kromatogram sonuçları.	98
Şekil 40. DBA/2J, BFMI860 ve BFMI861 ırklarının LD kas dokusundan elde edilen lipitlerin tek kromatogramları.	99
Şekil 41. LD kas dokusundan elde edilen lipitlerin DBA/2J, BFMI852 ve BFMI856 fare ırklarında karşılaştırmalı HPLC-ELSD kromatogram sonuçları.	100
Şekil 42. DBA/2J, BFMI852 ve BFMI856 ırklarının LD kas dokusundan elde edilen lipitlerin tek kromatogramları.	101
Şekil 43. LD kas dokusundan elde edilen lipitlerin DBA/2J, BMMI806, BMMI826 ve BMMI866 fare ırklarında karşılaştırmalı HPLC-ELSD kromatogram sonuçları.	102
Şekil 44. DBA/2J, BMMI806, BMMI826 ve BMMI866 ırklarının LD kas dokusundan elde edilen lipitlerin tek kromatogramları.	103
Şekil 45. BFMI fare ırklarının beslenme şekillerine ilişkin karşılaştırmalı HPLC-ELSD kromatogram sonuçları. A) BFMI852-SBD ve BFMI852-HFD. B) BFMI856-SBD ve BFMI856-HFD.	104
Şekil 46. BFMI fare ırklarının beslenme şekillerine ilişkin karşılaştırmalı HPLC-ELSD kromatogram sonuçları. A) BFMI860-SBD ve BFMI860-HFD. B) BFMI861-SBD ve BFMI861-HFD.	105
Şekil 47. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen TG (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen TG (mg/ml) miktarı.	106
Şekil 48. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen CO (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen CO (mg/ml) miktarı.	107
Şekil 49. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen C (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen C (mg/ml) miktarı.	107
Şekil 50. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen MG (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen MG (mg/ml) miktarı.	108
Şekil 51. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen PC (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen PC (mg/ml) miktarı.	109
Şekil 52. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen CLPN (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen CLPN (mg/ml) miktarı.	110

KISALTMALAR

FTIR	Fourier dönüşüm kızılötesi
ATR	Attenuated total reflectance
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ELSD	Evaporatif Işık Saçılım Dedektörü
BFMI	Berlin lipit faresi inbred
BMMI	Berlin kas faresi inbred
LD	Longissimus dorsi
Q	Kuadriseps
HFD	Yüksek yağ içerikli diyet
SBD	Standart beslenme diyeti
NEFA	Esterifiye olmamış yağ asidi
ipITT	İntraperitoneal insülin duyarlılığı testi

ÖZET

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaşam şekli ve yeme alışkanlıklarındaki değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkan obezite, gün geçtikçe artan görülme sıklığı ile insan sağlığını tehdit eden bir boyuta ulaşmıştır. Özellikle yüksek yağ içerikli diyetlerin tüketilmesinin artması obezite gelişiminde rol alan en önemli etkenlerden biridir. Tip 2 diyabet, dislipidemi, kardiovasküler problemler ve hipertansiyon gibi değişik klinik bozukluklar obezitenin yakın ilişki içerisinde bulunduğu en temel metabolik hastalıklardır. Genellikle bu metabolik bozukluklar birbirini tetiklemektedir. Obezitenin bu hastalıklarla paylaştığı ortak özelliği, vücutta insülin üretilmesine rağmen üretilen insülinin dokularda etkisini gösterememesidir. İskelet kas dokusundaki bozulan insülin duyarlılığı diyabet ve obezite patolojisindeki ilk belirtilerden biridir. İskelet kasında insülin direnci henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmakla beraber son yıllarda, iskelet kasında biriken lipid bileşenlerinin ve dağılımlarının insülin direnci oluşumunda belirleyici faktörler olduklarına yönelik bulgular artmaktadır. Bu nedenle, iskelet kasında biriken lipidlerin dağılımlarının ve bileşenlerinin belirlenmesi, obezitede insülin direnci oluşum mekanizmasının açıklanabilmesi için gereklidir.

Bu çalışmada, kontrol (DBA/2J ve C57BL/6J), Berlin kas faresi inbred (BMMI) ve Berlin lipid faresi inbred (BFMI) obez fare modellerinin *longissimus dorsi* (LD) ve *kuadriseps* (Q) iskelet kas dokuları makromoleküllerinde, özellikle lipid içeriğinde, oluşan yapısal ve fonksiyonel değişimlerin tespit edilmesi, bu kaslarda depolanan lipid çeşitleri ve dağılımlarının tayin edilmesi, böylelikle bu hayvan modellerinin iskelet kaslarının karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, projede iskelet kaslarındaki makromoleküllerin özelliklerinin belirlenmesi için ATR (attenuated total reflectance)-Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, bu makromoleküllerin, özellikle lipidlerin, kaslardaki dağılımının görüntülenebilmesi için FTIR mikrospektroskopisi, kas içeriğindeki lipidlerin hangi kas liflerinde yoğun olarak dağıldığının görüntülenebilmesi için konfokal mikroskopisi ve depolanan lipidlerin çeşitlerinin ve miktarlarının belirlenebilmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) teknikleri kullanılmıştır. Çalışmalarda standart beslenme diyeti (SBD) ile beslenmiş erkek kontrol (DBA/2J ve C57BL/6J), BMMI fareleri ve SBD veya yüksek yağ içerikli diyet (HFD) ile beslenmiş erkek BFMI fareleri iskelet kasları incelenmiştir.

Bu çalışmada incelenen BMMI ırkları içerisinde BMMI806, BFMI ırkları içerisinde BFMI860 ve BFMI861 farelerinin serum glikoz, trigliserit ve esterifiye olmamış yağ asidi

seviyelerinde artış olduğu, diğer ırklara nazaran insülin enjeksiyonuna daha geç cevap verdikleri görülmüştür. Bu sonuçlar, söz konusu fare ırklarının insülin direnci geliştirdiklerine işaret eder. BMMI806, BFMI860 ve BFMI861 ırklarının, incelenen tüm parametrelerde diğer BMMI veya BFMI ırkları ile karşılaştırıldıklarında daha farklı sonuçlar verdikleri tespit edilmiştir.

ATR-FTIR spektroskopisi sonuçlarına göre, BMMI806, BFMI860 ve BFMI861 farelerinin incelenen diğer ırklara nazaran daha fazla trigliserit, kolesterol ester ve doymuş lipid içeriğine, daha az doymamış lipid içeriğine, lipid yapılarında daha fazla metil grubu oranına ve daha kısa hidrokarbon zincirli lipitlere sahip oldukları görülmüştür. Tüm BFMI ırkları HFD ile beslendiklerinde iskelet kası lipid içerikleri artarken, BFMI852 ırkında HFD ile beslenmenin lipid içeriğinde pek bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir. HFD verilmiş gruplar arasında da en fazla lipid içeriği BFMI860 ırkında görülmüştür. BMMI ırkları içerisinde BMMI806, BFMI ırkları içerisinde BFMI860 ve BFMI861 fareleri iskelet kaslarında en düşük olefinik bant alanına ve doymamışlık indeksine sahip oldukları ve lipid peroksidasyonuna en yatkın olan ırklar oldukları gözlenmiştir.

HPLC-ELSD sonuçlarına göre SBD ile beslenmiş kontrol, BFMI ve BMMI; ve HFD ile beslenmiş BFMI fare ırklarının LD ve Q kas dokularından elde edilen lipidler nitel ve nicel olarak ayrılmıştır. Tespit edilen lipidlerin, BFMI ırklarında BMMI farelerine göre daha fazla olduğu görülmüştür. BFMI ırkları arasında lipid konsantrasyonu karşılaştırılmasına gidilecek olunursa, en çok lipid sırasıyla BFMI860 ve BFMI861 fare ırklarında görülmüştür. Diğer BFMI ırklarında ise bu kadar yüksek oranlarda lipid bulunmamıştır. Tayin edilen lipidlerde, HFD' nin etkileri de açıkça görülmüştür. HFD ile beslenen BFMI ırklarının, SBD ile beslenen ırkdaşlarına oranla daha çok lipite sahip oldukları bulunmuştur. Bu sonuç, projede kullanılan diğer bir teknik olan ATR-FTIR' dan elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir. BMMI ırkında myostatin mutasyonuna sahip olan BMMI826 ve BMMI866 kas farelerinde, lipid miktarı oldukça düşük çıkmıştır. Myostatin mutasyonuna sahip olmayan BMMI806 farelerinin lipid miktarının diğer kas farelerinden daha çok olduğu gözlenmiştir. Bulunan bu bulgular da ATR-FTIR tekniğinin sonuçlarıyla paralel olduğu görülmüştür. Farklı kas tiplerindeki lipid miktarlarının farklılığı da göz önüne serilmiş olup, LD iskelet kasında, Q kasına göre daha çok lipid olduğu tespit edilmiştir.

İskelet kas kesitlerinin görüntüleme yöntemleri ile incelenmeleri sonucu daha oksidatif bir metabolizmaya sahip olan tip IIa ve ara tip kas liflerinde daha yüksek miktarda nötral lipid biriktiği gözlenmiştir. Lipid birikiminin daha fazla olduğu bu kas

liflerinde daha yüksek lipit/protein dağılımı, lipit yapıları içerisinde daha yüksek miktarda metilen (CH₂) grubu, düşük miktarda metil grubu (CH₃), yüksek miktarda trigliserit içeriği (karbonil, C=O) ile daha uzun zincirli lipit yapıları bulunduğu; bu liflerin daha yüksek doymamışlık indeksi ve daha düşük glikojen içeriği tespit edilmiştir. Gözlenen bu lipit birikimi, diğer obez ırkları ile karşılaştırıldığında BFMI860 fareleri iskelet kaslarında daha yüksek miktarda gerçekleşmiştir, hatta HFD ile beslenmiş BFMI860 farelerinde daha muazzam bir birikim olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, projede incelenen karmaşık genetik yapıya sahip olmaları nedeniyle insanlarda da görülen ve kendiliğinden gelişen obeziteye model oluşturan inbred fare ırklarından BFMI860 ve BMMI806 farelerinin obezite çalışmalarına daha uygun oldukları belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmamız sonuçlarına göre, vücudun duruşundan sorumlu olan ve daha fazla tip IIa kas lifi içerdiği rapor edilen LD kasında incelenen parametrelerde Q kasına nazaran daha anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Obezite, iskelet kası, insülin direnci, fare modeli, ATR-FTIR spektroskopisi, FTIR mikrospektroskopisi, konfokal mikroskopisi, HPLC

ABSTRACT

Obesity, which arises from changes in lifestyle and feeding habits in developed and developing countries, is becoming a threat for human health due to its increasing prevalence. Especially, the increase in the consumption of high fat diets is one of the main factors that take role in the generation of obesity. Clinical disorders, such as type 2 diabetes, dislipidemia, cardiovascular diseases and hypertension, are all basic metabolic diseases in close relation with obesity. These metabolic disorders generally trigger each others' prevalence. The common property shared by obesity and these metabolic disorders is the inability of insulin to exert its action on tissues, even though insulin is produced by the body.

Impaired insulin sensitivity in skeletal muscle tissue is one of the most common symptom in pathophysiology of diabetes and obesity. While insulin resistance have not been yet fully established for clarity, in recent studies, more and more evidence reveals that the distribution and types of lipids are the deterministic factors in generation of insulin resistance. Therefore, determination of the distribution and types of lipids accumulated in the skeletal muscle are necessary in order to explain the generation of insulin resistance mechanism in obesity.

The aim of this study was to establish the structural and functional changes in *longissimus dorsi* (LD) and *quadriceps* (Q) skeletal muscle tissue macromolecules, especially lipid, and determination of the types and distribution of the lipids within these tissues in control (C57BL/6J and DBA/2J), Berlin muscle mouse inbred (BMMI) lines and Berlin fat mouse inbred (BFMI) lines and thus, to do the characterization of these skeletal muscle tissues of inbred mouse models.

For this this purpose, attenuated total reflectance (ATR)-Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to determine the properties of macromolecules, FTIR microspectroscopy was used to monitor the distribution of these macromolecules especially lipids within the skeletal muscles, confocal microscopy technique was used to monitor the lipid content of muscle fibers and to determine fibers types that these lipids accumulated more intensely and high performance liquid chromatography (HPLC) technique was used to determine the types and amounts of lipids stored in these muscles. In this study, skeletal muscle tissues of the control (C57BL/6J and DBA/2J), BMMI mice which were fed with standard breeding diet (SBD) and BFMI mice which were fed with either SBD or high-fat diet (HFD) were investigated.

In this study, serum levels of glucose, triglyceride and non-esterified fatty acid were found to be increased in BMMI806 among the BMMI lines and BFMI860, BFMI861 within the BFMI lines and these lines showed a slower response to insulin injection than the other lines. These results were the indicators of the development of insulin resistance in these lines. BMMI806, BFMI860 and BFMI861 lines represented different properties in comparison to the other lines.

ATR-FTIR spectroscopic results revealed that BMMI806, BFMI860 ve BFMI861 mice possess higher amount of triglyceride, cholesterol ester and saturated lipid content, lower amount of unsaturated lipid content, more methly groups in lipid structure and lipids with shorter hydrocarbon chain lenght in comparison to other groups. The lipid content in skeletal muscles of all BFMI mice fed with a HFD increased, except for BFMI852 line which did not respond to feeding with HFD in terms of lipid content. The highest lipid content was found to be in BFMI860 line among the groups fed with a HFD. It had been demonstrated that the skeletal muscles of BMMI806 line amoung BMMI lines, BFMI860 and BFMI861 lines within BFMI mice had the lowest olefinic band area and unsaturation index; therefore these lines are more prone to lipid peroxidation.

Lipids extracted from LD an Q skeletal muscles of control, BFMI and BMMI lines of SBD and also BFMI lines of HFD were separated, characterized and quantified by HPLC-ELSD technique. In BFMI lines, lipids were detected in higher concentrations regarding to BMMI lines. Among BFMI lines, the highest lipid concentrations were seen in BFMI860 and BFMI861 lines, respectively. In BFMI lines, other than BFMI860 and BFMI861, the concentration of detected lipids were low. The effects of HFD on the concentration of lipids were obvious. In BFMI lines which fed with HFD, had more lipid content compared to BFMI mice which fed with SBD. These findings support the ATR-FTIR spectroscopic results, which was performed on the same tissues of same lines. In LD and Q muscles BMMI826 and BMMI866 lines, which were characterized as myostatin mutants, were found to have less lipid content. In myostatin wild-type BMMI806 line, the lipid concentration was detected to be higher than the other BMMI lines. These findings are also in agreement with the ATR-FTIR spectroscopic results. Lipid amounts in LD and Q skeletal muscles were also determined and compared with each other. According to the results, lipid concentration was found to be higher in LD skeletal muscle when compared to the lipid concentration in Q muscle.

Via imaging techniques, higher amount of neutral lipid accumulation was observed in the cross-sections of skeletal muscle type IIa and intermediate muscle fiber, which do

have more oxidative metabolism. In these muscle fibers where high lipid accumulation is present, high lipid/protein distribution, high amount of methylene (CH₂) groups, low amount of methyl groups (CH₃) in the lipid structure, high amount of triglyceride content (carbonyl, C=O) and lipids with longer chain length were observed. Furthermore, it was also found that, these fibers display a higher unsaturation index and lower glycogen content. This lipid accumulation was found to be the highest in the skeletal muscles of BFMI860 mice when compared to other obese mouse lines. The effect of HFD on BFMI860 mouse line regarding to the lipid accumulation, was observed to be more dramatic.

When all results obtained were evaluated, with their genetically complex background, BFMI860 and BMMI806 were determined to be the most suitable lines for the investigation of spontaneous obesity in humans among all BFMI and BMMI lines. Furthermore, according to the results of this study, in LD muscles which is responsible for the posture and include more type IIa fibers than Q muscle, represented more significant results.

Keywords: Obesity, skeletal muscle, insulin resistance, mouse model, ATR-FTIR spektroskopi, FTIR spektroskopi, konfokal mikroskopi, HPLC

1.GİRİŞ

1.1. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, değişik inbred obez fare modellerinin *longissimus dorsi* (LD) ve *kuadriseps* (Q) iskelet kas dokuları makromoleküllerinde, özellikle lipit içeriğinde, oluşan yapısal ve fonksiyonel değişimlerin tespit edilmesi, bu kaslarda depolanan lipit çeşitleri ve dağılımlarının tayin edilmesi, böylelikle bu hayvan modellerinin iskelet kaslarının karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Gün geçtikçe artan görülme sıklıkları ile insan sağlığının tehdit eden obezite, tip 2 diyabet ve metabolik sendrom gibi hastalıkların altında yatan temel neden insülin direncidir. İnsülinin, iskelet kası ya da yağ dokusu gibi periferik dokularda etkisini gösterememesi durumuna insülin direnci adı verilir (GERICH, 2003). İskelet kas dokusu vücutta glikoz dağılımını ve içdengesini (homeostasis) belirleyen temel dokulardan biridir. İskelet kas dokusundaki bozulan insülin duyarlılığı diyabet ve obezite patolojisindeki ilk belirtilerden biridir (VENOJARVI v.d, 2005). İskelet kasında insülin direnci henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmakla beraber son yıllarda, iskelet kasında biriken lipitlerin bileşimlerinin ve dağılımlarının insülin direncinin belirleyici faktörleri olduğuna yönelik bulgular artmaktadır (OAKES v.d., 1997, HE v.d., 2001, GOODPASTER v.d., 2001; KUHLMANN v.d., 2005). Bu nedenle, iskelet kasında biriken lipitlerin dağılımlarının ve bileşenlerinin belirlenmesi, obezitede insülin direnci oluşum mekanizmasının açıklanabilmesi için gereklidir. Ayrıca, obezitede kasların lipit içeriklerinde gerçekleşen içeriksel, yapısal ve fonksiyonel değişimlerin tespit edilmesi insülin direnci oluşum mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Bu proje ile bu alandaki eksikliklerin giderilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, kas kompozisyonu ve obezite gibi karmaşık özellikleri araştırmak için geliştirilmiş olan inbred fare ırkları kullanılmıştır. Kullanılan Berlin lipit faresi (Berlin Fat Mouse Inbred, BFMI) ve Berlin kas faresi (Berlin Muscle Mouse Inbred, BMMI) ırkları sırası ile yüksek yağ içeriğine sahip olma ve yüksek kas içeriğine sahip olma durumlarına göre seçilerek inbred olarak üretilmektedirler. Bu inbred ırklar, belirli bir gen mutasyonundan dolayı oluşan obezite modelini değil, karmaşık genetik yapıya sahip olmaları nedeniyle insanlarda da görülen ve kendiliğinden gelişen obeziteye model oluşturmaları nedeni ile önem taşımaktadırlar. Bu değişik fare ırklarının iskelet kaslarında görülen yapısal özelliklerin ve farklılıkların tespiti özellikle bu ırkların genotipleri ile

fenotipik özellikleri arasındaki ilişkinin açıklanmasında ve bu hayvan modellerinin karakterizasyonu için önem taşımaktadır. Ayrıca, bu ırklardaki insülin direnci gelişimi parametreleri de incelenerek, insülin direnci gösteren ırklarda iskelet kası makromolekülerinin dağılımında görülen değişimlerin de tespit edilmesi ve insülin direnci oluşum mekanizmasının anlaşılmasına katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, projede iskelet kaslarındaki makromoleküllerin özelliklerinin belirlenmesi için ATR-FTIR spektroskopisi, bu makromoleküllerin, özellikle lipitlerin, kaslardaki dağılımının görüntülenebilmesi için FTIR mikrospektroskopisi, kas içeriğindeki lipitlerin hangi kas liflerinde yoğun olarak dağıldığının görüntülenebilmesi için konfokal mikroskopisi ve depolanan lipitlerin çeşitlerinin ve miktarlarının belirlenebilmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) teknikleri kullanılmıştır.

1.2. Proje Önerisinde Tanımlanan Çalışma ile Gerçekleştirilen Çalışmanın Karşılaştırılması

Proje önerisinde, 15 özgün fare ırkının *longissimus dorsi* ve *kuadriseps* iskelet kaslarının projedeki tekniklerle incelenmesi planlanmıştır. Proje önerisinde incelenecek olan bu ırklar genetik çalışmaları yürüten Alman ortağımız tarafından, iki değişik kontrol inbred ırkı (C57BL/6J ve DBA/2J), 7 Berlin kas inbred fare ırkı (BMMI806, BMMINN814, BMMINN831, BMMICC804, BMMICC801, BMMICC824, BMMI826), 4 Berlin lipit inbred fare ırkı (BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861), ve iki outbred fare ırkı (BMM (W+G+) ve BFM (F+)) olarak belirlenmiştir. Önerilen projemiz kabul edildikten sonra incelenmesi planlanan bu fare ırklarından BMMINN814, BMMINN831, BMMICC804, BMMICC801 ırkları ile iki outbred ırk (BMM (W+G+) ve BFM (F+)) Alman ortağımızın belirttiğine göre, üretim aşamasında ortaya çıkan problemler, beklenmedik hayvan ölümleri nedeni ile üretilememiş ve bu ırkların projede incelenmeleri için üretime elverişli ırklar olmadığına karar verilmiştir. BMMICC824 fare ırkı yerine BMMI826 fare ırkının kullanılmasına karar verilmiş ve üretimde yaşanan bu problemler üzerine projede başvurusunda yer almayan ve üretiminde problem olmayan BMMI866 fare ırkı dokuları projenin Alman ortağı tarafından tarafımıza gönderilmiştir. Hayvan yetiştirilmesi ile ilgili yaşanan bu sorunlar, projenin Alman ortağı Prof. Dr. Gudrun Brockmann'dan alınan bir yazı da eklenerek projenin dördüncü dönem ara raporunda Sağlık Bilimleri Grubuna bildirilmiş, grubun bu gelişmeler ile ilgili onayı alınmıştır.

Bu proje çalışmasında iki değişik kontrol inbred ırkı (C57BL/6J ve DBA/2J), 3 Berlin kas inbred fare ırkı (BMMI806, BMMI826, BMMI866), 4 Berlin lipit inbred fare ırkı (BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861) proje kapsamında önerildiği şekilde kapsamlı olarak incelenmiş ve obezite çalışmalarında kullanılabilecek en uygun fare ırkları açığa çıkarılmıştır. Belirtilen bu ırkların her iki iskelet kasından alınan örnekler ATR-FTIR spektroskopisi çalışmaları ile incelenmiş, sonuçlar değerlendirilerek mevcut bulunan obezite durumundan en çok etkilenmiş olan ırklar belirlenmiştir. ATR-FTIR spektroskopisi çalışmamız bir ön inceleme olarak kullanılmış ve bu ön inceleme sonuçları değerlendirilerek çok daha uzun veri toplama süresi gerektiren (ATR-FTIR spektroskopisi ile 10 dakika incelen bir tek örnek için mikroskopta 2,5 saat), analizi çok daha uzun zaman alan (ATR-FTIR spektroskopisi ile 1 saat süren analiz zamanı mikroskopta 6 saat civarında gerçekleşmektedir) ve ATR ye göre çok fazlasıyla masraflı olan görüntüleme teknikleri ile yapılacak çalışmalar için incelenmesi önem arz eden ırklar belirlenmiştir. Bu nedenle BFMI860 ve BFMI861 ırkları ile karşılaştırıldığında daha az obezite özelliği gösteren ve benzer sonuçlar veren BFMI852 ve BFMI856 ırklarından sadece BFMI856 ırkının görüntüleme yöntemleri ile incelenmesine karar verilmiştir. Yine benzer nedenlerden dolayı, görüntüleme teknikleri ile yapılacak olan incelemeler için iki kontrol grubundan doymamış lipit içeriği, toplam lipit içeriği gibi spektral parametrelerde gösterdiği özellikler nedeni ile DBA/2J ırkı seçilmiştir. Diğer örnek grupları çalışmadaki önemleri nedeniyle mikroskopi çalışmalarında incelenmiştir.

Hayvan yetiştirilmesi ile ilgili bu gelişmelere ilaveten, proje önerisinde kas kesitlerinde lipit içeriğinin belirlenmesi için konfokal mikroskopisi çalışmalarında, literatürdeki makalelere dayanarak, oil red O boyası ile kas kesitleri içerisindeki nötral lipitlerin boyanması ve görüntülenmesi planlanmıştır (VAN LOON v.d., 2003; SHAW v.d., 2008). Literatürdeki çalışmalarda ekseriyetle insan kasları kullanılmış olup fare modelleri iskelet kasları içerisindeki lipitleri görüntülemeye yönelik hiç bir konfokal mikroskopisi çalışması bulunmamaktadır. Proje dahilinde fare iskelet kasları kullanılarak yapılan ön çalışmalarda oil red O ve BODIPY boyaması denenmiş, fakat lipit damlacıklarının konfokal mikroskopisi ile görüntülenebileceği bir boyama kalitesi elde edilememiştir. Bu sonucun nedeninin insan ve hayvan dokuları arasındaki farklılıklardan dolayı bu boyamaların fare iskelet kası kesitlerinde düzgün bir sonuç vermediği düşünülmektedir. Optimizasyon çalışmaları sırasında karşılaşılan bu gelişmeler üzerine lipit içeriğini görüntülemek için nasıl bir boya kullanılabileceği araştırılmıştır. Bu boyalar dışında lipit taneciklerini görüntülemek için perilipin protein ailesinden olan yağ farklılaşması ile

ilişkili protein (adipose differentiation related protein, ADRP) ve lipit depolanması ile ilişkili protein 5 (lipid storage droplet protein 5, OXPAT) antibadilerinin lipit taneciklerini belirlemek amacıyla kullanıldığı görülmüştür (PRATS v.d., 2006; SHAW v.d., 2009; MINNAARD v.d., 2009). Bu proteinler, lipit taneciklerini çevrelemek suretiyle lipitlerin etrafında onları sitoplazmadan ayıran bir kalkan oluşturmaktadırlar. Fakat bu proteinler, özellikle OXPAT, sitoplazma içerisinde serbest olarak da bulunabildiği için bu antibadilerin kullanımının lipit dağılımı hakkında yanıltıcı sonuçlara sebep olabileceği düşünülmüştür. Bu boyama metotlarına ilaveten yeni geliştirilen LD540 isimli nötral lipit boyası ile yapılmış çalışmalara rastlanmıştır (SPANDL v.d., 2009). Piyasada satılmayan fakat kullanan gruplarla iletişime geçerek ücretsiz temin ettiğimiz LD540 ile yapılan denemeler sonucunda çok daha güçlü sinyaller elde edilmiş ve fare iskelet kas kesitlerinde lipit dağılımının bu boya kullanımı ile yapılmasına karar verilmiştir. Konfokal mikroskopisi çalışmaları ile ilgili oluşan bu gelişmeler, projenin beşinci dönem ara raporunda SBAG grubuna sunularak grubun onayı alınmıştır.

Projemiz dahilinde yapılan ön çalışmalar sonrası ortaya çıkan tüm değişiklikler ve proje planında yapılan değişiklikler ara dönem gelişme raporları ile SBAG grubuna bildirilmiştir. Projemizin Alman ortağı tarafından yürütülen kısmı Ocak 2012 tarihinde sona ermiş ve Alman grubunun teslim ettiği final raporu ile projenin Almanya ayağı başarı ile sonuçlandırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obezite

Obezite, özellikle enerji metabolizmasında oluşan aksaklıklar sonucu ortaya çıkan ve pek çok hastalıkla yakın ilişki içinde bulunan metabolik bir bozukluktur. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaşam şekli, yeme ve spor alışkanlıklarındaki değişikliklerin sonucunda ortaya çıkan obezite, gün geçtikçe artan görülme sıklıkları ile özellikle batılı yaşam stilini benimseyen ülkelerde insan sağlığını tehdit eden bir boyuta ulaşmıştır (GEDİK, 2003). Bu nedenle obezite, son yıllarda tüm yaşam bilimi ve sosyal bilimler alanlarında yoğun olarak çalışılan önemli bir araştırma konusudur. Obezite, özellikle yüksek miktarda yağ içeren besinlerin tüketilmesi ile fiziksel aktivitenin azalması dolayısı ile alınan ve harcanan enerji arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklanır. Vücut homeostazının bozulması sonucunda vücut yağ kitlesi artmakta, özellikle abdominal

bölgede toplanan yağ dokusu, insülin direnci ve karbonhidrat metabolizması bozukluğunu ortaya çıkaran nedenler arasında önemli bir rol oynamaktadır. Vücutta değişen enerji metabolizması ve yağ dengesi sonucu oluşan obezite başka metabolik rahatsızlıkların oluşmasına neden olmaktadır. Bu rahatsızlıklar arasında, dislipidemi, kardiovasküler problemler ve hipertansiyon gibi değişik klinik bozukluklar obezitenin yakın ilişki içerisinde bulunduğu en temel metabolik hastalıklardır (REAVEN, 1988; GOODPASTER v.d., 2004; KUHLMANN v.d., 2005).

Genel olarak metabolik hastalıklar birbirleriyle ilişki içindedirler ve bu hastalıkları birbirlerinden tamamen ayırmak mümkün değildir. Obezitenin tip 2 diyabet gibi metabolik bozukluklarla paylaştığı ortak özelliği, vücutta insülin üretimi olmasına rağmen, üretilen insülinin dokularda etkisini gösterememesidir. İnsülinin, iskelet kası yada yağ dokusu gibi periferik dokularda etkisini gösterememesi durumuna insülin direnci adı verilir (GERICH, 2003). Metabolik bozuklukların oluşumunda önemli rol oynayan insülin direnci oluşum mekanizması, hakkında değişik öneriler olduğu halde, kesin olarak açıklanabilmiş değildir (KAHN ve FLIER, 2000; HAN v.d., 2004). Bu öneriler arasında, reseptörlerin insüline duyarlıklarının azalması, insülin reseptör sayısında azalma olması, hiperglisemi varlığı, insülin sinyal yolağındaki proteinlerin işlevlerini kaybetmeleri sayılabilir. Obezite gibi metabolik hastalıkların patolojilerinin anlaşılabilmesi için tüm vücutta insülin direnci oluşum mekanizmasının açıklanması gerekmektedir (FURLER v.d., 1997, NGUYEN v.d., 2006). Obezite ve insülin direnci arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için pek çok çalışma yürütülmüştür (EL-HASCHIMI v.d., 2000; STEPPAN v.d., 2001; XU v.d., 2003). Yapılan çalışmalarda, insülin sinyal yolağını inhibe ederek insülinin hücrede etkisini göstermesini önleyen tümör nekroz faktörü α (TNF- α) gibi bazı sitokinlerin, obezitede adipoz dokusu ve makrofaj gibi immün sistem elemanlarından yüksek miktarda salgılandıkları tespit edilmiştir (HOTAMISLIGIL v.d., 1996; HOTAMISLIGIL v.d., 1993; SETHI ve HOTAMISLIGIL, 1999; AGUIRRE, 2000). Bunun yanı sıra, plazma lipit ve yağ asidi oranının da obezitede arttığı ve hücre içerisinde depolanan yağ asitlerinin de insülin yolağı üzerine olumsuz etkileri olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (KATENEY v.d., 1996; SCHULMAN, 2000). Bu yağ asitleri ve sitokinlerin, insülin reseptörüne bağlanan proteinleri (IRS) serin aminoasitlerinden fosforlayarak inhibe etmek suretiyle insülin sinyal yolağını olumsuz etkiledikleri ve obezitede görülen insülin direnci oluşum mekanizmasına katkıda buldukları düşünülmektedir (WELLEN ve HOTAMISLIGIL, 2005). Bununla beraber, obezitede görülen artmış sitokin salgılanması, obeziteye kronik bir enflamasyon durumunun eşlik ettiğini göstermektedir (HOTAMISLIGIL, 2003). Obezitedeki insülin

direnci oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülen bir diğer mekanizma ise hücre içine alınan yağ asitlerinin miktarlarının artmasıyla mitokondri işlevlerindeki artan gereksinim nedeni ile reaktif oksijen türlerinin yoğun olarak üretilmesidir. Reaktif oksijen türlerindeki artış da immün sistemi ve sitokin üretimini tetikleyerek insülin yolağı üzerine olumsuz etki yapmaktadır (FURUKAWA v.d., 2004; LIN v.d., 2005). Bu etkinin yanı sıra, üretilen bu reaktif oksijen türleri dokulardaki makromoleküller üzerinde zararlı etkiler oluşturabilmektedir (SEVERCAN v.d., 2005).

Obezite gibi birçok metabolik hastağın kaynağı hücre düzeyindeki bazı işleyiş bozukluklarıdır (STORLIEN v.d., 1998; RASK-MADSEN ve KING, 2007). Bu işlev bozuklukları, hücre fonksiyonlarını yürüten hücre zarı, iyon kanalları, reseptörler gibi organel ve moleküllerinin yapısal ve regülatör bozuklukları ve birbirleri ile etkileşimlerdeki değişimler sonucunda ortaya çıkmaktadır (AWAYDA v.d., 2004; WANG ve ZHANG, 2005; LUNEVA v.d., 2007). Dolayısıyla, dokularda oluşan moleküler düzeydeki değişikliklerin tayini, hastalıkların moleküler mekanizmalarını ve ilerleyişlerini çözümlenmek açısından büyük önem taşımaktadır. Moleküler çalışmalarda ayrı bir öneme sahip membranların lipit kompozisyonunu belirlemede genetik ve çevresel faktörlerin etkisi büyüktür (PAN ve STORLIEN, 1993).

2.2. İskelet kası ve insülin direnci

Vücutta insülin metabolizmasında görev alarak insülin direnci oluşumunda rol oynayan temel organ ve dokular karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusudur. İskelet kas dokusu insülin uyarımında kandaki glikozun yaklaşık %80'ini aldığından glikoz dağılımını ve vücutta glikoz içdengesini (homeostasis) belirleyen temel dokulardan biridir (DEFRONZO v.d., 1981; PETERSEN ve SHULMAN, 2002; VENOJARVI v.d, 2005). İskelet kas dokusundaki bozulan insülin duyarlılığı diyabet ve obezite patolojisindeki ilk belirtilerden biridir (VENOJARVI v.d, 2005). Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda, diyabetin önlenmesi ve tedavisinde fiziksel egzersizin önemli bir terapi olarak görülmesi de kasların insülin direnci oluşumundaki ana kaynak olmamalarına rağmen, önemli rol oynadıklarını göstermektedir (KNOWLER v.d., 2002). Kaslar fiziksel egzersiz sırasında gerek duydukları enerjinin büyük bir kısmını glikozdan karşılarlar. İnsülin direnci oluşumu sonucu kandaki glikoz kaslara alınmadığında lipit ve protein metabolizmalarında bozukluklar ortaya çıkar.

İskelet kasları içerdikleri kas liflerinin yapısal özelliklerine göre değişik yapısal ve fonksiyonel özellikler kazanmaktadır. İskelet kası yavaş kasılan (oksidatif) ve hızlı kasılan (glikolitik) liflerden oluşur. Yavaş kasılan kas lifleri (tip I) yüksek oksidatif kapasiteye sahiptir ve artmış yağ asidi oksidasyonu, artmış trigliserit depolanması, ve azalmış glikolitik kapasiteye sahip olmaları ile karakterizedir. Bu kaslar kırmızı kaslar olarak da bilinir, yavaş kasıldıkları için geç yorulurlar ve insüline daha duyarlıdır (insulin-sensitive). Hızlı kasılan kas lifleri (tip II) iki katagoride toplanır. Tip IIa, hızlı kasılan oksidatif lifler, yüksek oksidatif ve düşük glikolitik kapasiteye sahiptir, bu açıdan tip I kaslara yakın özellikler gösterirler. Tip IIb, hızlı kasılan glikolitik lifler, ise düşük oksidatif ama yüksek glikolitik kapasiteye sahiptir. Tip IIb lifleri beyaz kaslar olarak da bilinir, hızlı kasıldıkları için çabuk yorulurlar, çok çabuk kas gücü kazanırlar ve insüline daha dirençlidirler (insulin-resistant) (SONG v.d., 1999). Bu kas tiplerinden insüline en duyarlı olanlar tip I kaslardır, daha sonra tip IIa ve ondan sonra da tip IIb gelir (VENOJARVI v.d, 2005). Bu kas tiplerinin metabolik özellikleri ve iskelet kas dokusundaki kompozisyonları; iskelet kasındaki glikoz iletimini, glikojen sentezinin düzenlenmesini etkilemektedir. Ayrıca kas dokusunda kas lif çeşitine ve özelliklerine özgü olarak oluşan insülin sinyalizasyonuna bağlı yollardaki bozukluklar metabolik hastalıkların fenotipik özelliklerini etkileyebilmektedir (SONG v.d., 1999; VENOJARVI v.d, 2005).

İskelet kasında insülin direnç oluşum mekanizması halen kesin olarak bilinmemektedir. Önerilen mekanizmalar arasında kas hücreleri içinde lipit birikimi (MACHANN v.d., 2004), insülin reseptör proteinlerinin serin/terionin amino asitlerinde fosfatlanması ve aktivitelerini kaybetmeleri (STORGAARD v.d., 2001) ve GLUT4 glikoz taşıma proteinlerinin membrandan uzaklaşmaları (ZIERATH ve WALLBERG-HENRIKSSON, 2002) sayılabilir. İskelet kasında insülin direnci olduğu durumlarda yağ oksidasyonu azalmaktadır. Bu durumun, mitokondriyel fonksiyonlarda oluşan bozukluktan kaynaklandığı düşünülmektedir (HEGARTY v.d., 2003; HAN v.d., 2004). Tip 2 diyabet ve obezite hastalıklarının ve insülin direncinin patolojilerinin anlaşılabilmesi için iskelet kasında insülin direnci oluşum mekanizmasının açıklanması gerekmektedir (FURLER v.d., 1997, NGUYEN v.d., 2006).

Kas hücrelerindeki lipit içeriği tüm vücuttaki insülin duyarlılığının iyi bir indikatörüdür ve bu lipit içeriğinin diyabet oluşumuna neden olan insülin direnci ile ilişkisi pek çok çalışmada gösterilmiştir (OAKES v.d., 1997, HE v.d., 2001, GOODPASTER v.d., 2001; KUHLMANN v.d., 2005). İskelet kasındaki lipit miktarı ve insülin duyarlılığı birbirleriyle ters orantılı bir şekilde değişim göstermektedirler (GOODPASTER v.d., 1997;

PAN v.d., 1997; PERSEGHIN v.d., 1999). Kas içerisinde oluşan bu lipotoksistenin glikoz metabolizmasının azalmasına sebep olduğu düşünülmektedir (RANDLE v.d., 1967). Son yıllarda, iskelet kasında bulunan lipitlerin bileşimlerinin ve dağılımlarının insülin direncinin belirleyici faktörleri olduğuna yönelik bulgular artmaktadır. Diyabette iskelet kası lipit bileşenlerinin, özelliklerinin ve miktarlarının tayinine yönelik pek çok çalışma yapılmasına rağmen (BORKMAN v.d., 1993; PAN v.d., 1997; GOODPASTER v.d., 2000a; BOZKURT v.d., 2007) bu lipitlerin dağılımlarının ve bu dağılımın insülin işlevi üzerine olan etkilerinin belirlenebilmesi için sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Obez hastalarda kas lifleri arasında ve kas hücreleri içerisinde lipit birikiminin artmış olduğu gözlenmiştir (GOODPASTER v.d., 2000b). Bu bulgular, lipit depolanma bölgelerinin obezitede insülin direnci oluşumunda belirleyici bir faktör olduklarını göstermektedir. Bu nedenle, iskelet kasında biriken lipitlerin dağılımlarının ve bileşenlerinin belirlenmesi, obezitede insülin direnci oluşum mekanizmasının açıklanabilmesi için gereklidir.

2.3. Obezite araştırmalarında kullanılan hayvan modelleri

Deneysel çalışmalarda hayvan deneyleri, yaşam biçiminden ve farklı kişisel hastalık karakteristiklerinden kaynaklanan olası değişimleri elememizi sağlamaları açısından hastalık ve/veya ilaç alakalı etkilerin çalışılmasında faydalı modellerdir (NISSEN-MEYER v.d., 2008). Obezite, sık rastlanan, çoklufaktöriyel çevresel ve genetik faktörlerin birleşimi ile oluşan ve kronik bir enflamasyon durumunun eşlik ettiği bir metabolik bozukluk olarak tanımlanmaktadır (GEDİK, 2003; HOTAMISLIGİL, 2003; HOTAMISLIGİL, 2005). Çevresel faktörlerin obezitenin ortaya çıkışında mutlak bir etkisi olsa da, yapılan pek çok çalışmada görüldüğü gibi hastalığın güçlü bir genetik temelini olduğu da yadsınamaz bir gerçektir. Hayvan modelleri ile obezite üzerine yapılan çalışmalarda çoğunlukla genetik bir mutasyon ile oluşturulmuş modeller kullanılmıştır. Bugüne kadar obezite ve insülin direncinin oluşmasına sebep olduğu düşünülen genlerin araştırılması için yapılan çalışmalarda, kendiliğinden obez olan Zucker (fa/fa) sıçanlar (PHILLIPS v.d., 1996), leptin eksikliği olan obez (Lepob/Lepob) fareler (ZHANG v.d., 1994), adipozit diferensiyasyonunda görev alan C/EBP- α transkripsiyon faktörünün knock-out edilmesiyle Cebp fare modelleri (LEFTEROVA ve LAZAR, 2009), PPAR γ_2 transkripsiyon faktörünün knock-out edilmesiyle oluşturulan Prarg fareleri (LEFTEROVA

ve LAZAR, 2009), Agpat2 knock-out fareleri (CORTES v.d., 2009) ve Cav1 nakavt (knock-out) fareleri kullanılmıştır (RAZANI v.d., 2001).

İnsanlarda görülen obeziteye daha yakın olabilecek modeller ise çevresel ve genetik faktörlerin birleşmesi sonucunda meydana gelen bir obeziteye sahip hayvan modelleridir. Çevresel faktörlerin içerisinde beslenme alışkanlığı, örneğin uzun süreli olarak yüksek yağ içeren besinlerin tüketilmesi hem obezite hem de diyabetin oluşumuna katkısı nedeniyle birçok çalışmaya konu olmuştur.

Projemiz bünyesinde incelenen fare modelleri uzun bir süreçte yüksek yağ oranlarına (BFMI ırkları) ve yüksek kas kütlelerine (BMMI ırkları) göre seçildikleri için obezite oluşumunda ve gelişim üzerinde rol oynayan yeni genlerin bulunması amacıyla yapılan çalışmalara ışık tutmaktadırlar. Bu fare ırkları, genomlarında delesyon ya da knock-out mutasyonları yapılmadığı ve inbred olarak çiftleştirilme ile nesiller boyu seçilerek yetiştirildikleri için genetik yapıları bakımından kompleks farelerdir (WAGENER v.d. 2006, MEYER v.d. 2009). Projemizin Alman ortağı olan Prof. Dr. Gudrun Brockmann ve grubu, bu karmaşık genetik yapıya sahip inbred fare modellerinin gösterdikleri obezite fenotipinin altında yatan genetik nedenleri araştırmaktadır. Bu fare modelleri gerek karmaşık genetik yapıları gerekse yüksek yağ içerikli diyeteye verdikleri muazzam cevap nedeni ile insanlarda görülen obeziteye benzer bir obezite durumu gösterdikleri için ileride yapılacak obezite araştırmalarında çok önemli model organizmalar olacaklardır.

2.4. Projede Kullanılan Biyofiziksel ve Biyokimyasal Teknikler

2.4.1. Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve mikrospektroskopisi

Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi kızılötesi dalga boyunda elektromanyetik ışınla uygulamasıyla moleküllerin titreşimlerini ölçerek değişik titreşim gruplarını görüntüleyen ve böylece moleküllerin mikroçevresi hakkında önemli bilgiler veren hassas bir tekniktir. FTIR spektroskopisinden elde edilen bir spektrum, bir bileşiğin yapısındaki bağ türleri, fonksiyonel gruplar ve dolayısı ile sistemde mevcut moleküllerin belirlenmesi; bunların konsantrasyonu ile yapı ve fonksiyonu hakkında önemli bilgiler verir. FTIR spektroskopisi ile kullanılan örneğe zarar vermeden biyolojik sistemler hakkında değerli bilgiler elde edilebilir (OZEK v.d., 2009, GARIP v.d., 2009). Bir bileşiğin titreşim spektrumu o bileşiğe özgüdür ve optik izomerler dışında hiçbir bileşiğin

titreşim spektrumu bir başkası ile aynı değildir. Her bir fonksiyon grubunun teşhisi o grup için belirgin olan titreşim frekansları ile sağlanır. Değişik fonksiyonel gruplara ait titreşim frekansları, daha önce literatürde yer verilen bilgilerden veya atlaslardan faydalanılarak tanımlanmaya çalışılır.

Bu teknik kullanılarak çok düşük konsantrasyondaki örnekler hem in vivo hem in vitro koşullarda incelenebilmekte; protein, lipit, DNA, kolesterol, karbohidrat gibi hücrelerin yapıtaş molekülünün fonksiyonel gruplarındaki değişimler, ve dolayısıyla bu fonksiyonel grupların ait oldukları moleküllerdeki değişimler hassaslıkla belirlenebilmektedir (SEVERCAN v.d., 2000; SEVERCAN v.d. 2003; BOYAR v.d., 2004; SEVERCAN v.d., 2005; CAKMAK v.d., 2006; TOYRAN v.d. 2006; DOGAN v.d., 2007; BOZKURT v.d., 2007; OZEK v.d., 2009; BOZKURT v.d., 2010; OZEK v.d., 2010; CAKMAK v.d., 2011). FTIR spektroskopisi sağladığı yüksek sinyal-gürültü oranı ile düşük transmittansa sahip sulu protein çözeltilerinin de incelenebilmesine olanak sağlamakta (PELTON ve MCLEAN, 2000); özellikle proteinlerin ikincil yapı ve miktarları hakkında önemli bilgiler elde edilebilmektedir (HARIS ve SEVERCAN, 1999; SEVERCAN v.d., 2004; NILSSON, 2004).

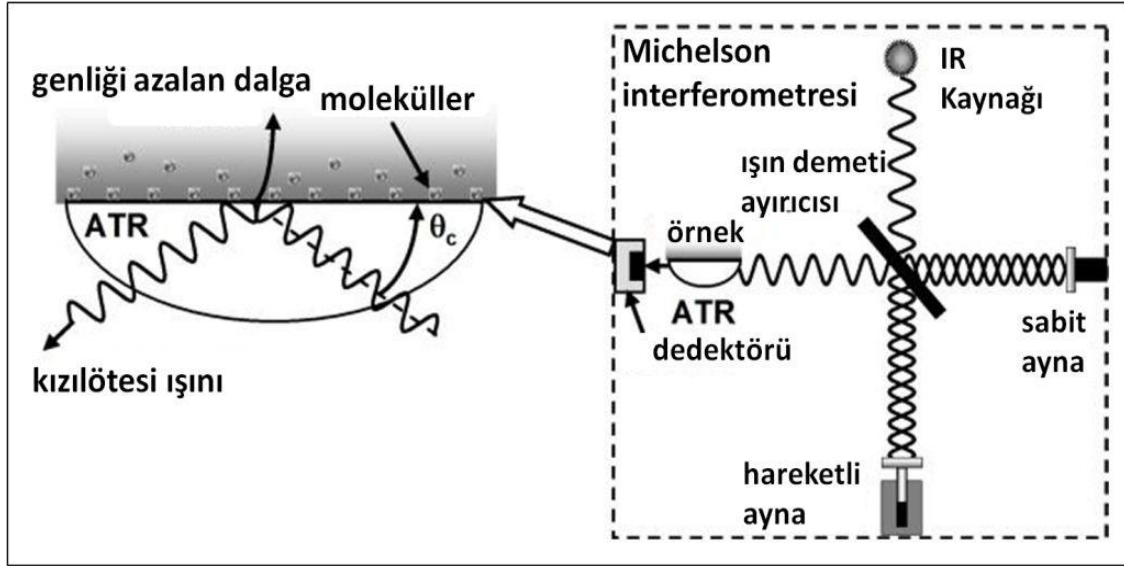
Genel olarak FTIR spektroskopisinde kullanılan değişkenler bant şiddeti / bandın altında kalan alan, bant konumu (frekans değeri) ve bant genişliğidir. Bant şiddeti ve alanı maddenin konsantrasyonu hakkında bilgi verirken, bant konumu düzen/düzensizlik hakkında, bant genişliği ise dinamik hakkında bilgi verir (CAMERON ve CHARETTE, 1981; CAKMAK v.d., 2003; TOYRAN ve SEVERCAN, 2003). Özellikle biyolojik çalışmalarda, biyolojik sistemlere zarar vermeden moleküler düzeyde inceleyebilmesi nedeniyle FTIR spektroskopisi tekniği daha da önem kazanmaktadır (BOYAR ve SEVERCAN, 1997; MELIN v.d., 2000; SEVERCAN v.d., 2000; MELIN v.d., 2001; CAKMAK v.d., 2006; GORGULU v.d., 2007; OZEK v.d., 2010; BOZKURT v.d., 2010; CAKMAK v.d., 2011).

Kızılötesi spektroskopisinin yaygın bir şekilde kullanılmasının altında yatan nedenler çeşitlidir:

- (i) örnek hazırlama işlemlerinin daha kolay olması;
- (ii) örneklerin gaz, sıvı ve katı hallerinde incelenebiliyor olması;
- (iii) nitel yorumların yapılabilmesi ve
- (iv) verilerin hızlı bir şekilde elde edilebilmesi.

FTIR spektroskopisi ayrıca biyolojik çalışmalar açısından lipidlerin diğer biyomoleküllerle etkileşimleri, proteinlerin ikincil yapılarının belirlenmesi, kanser, diyabet gibi patolojik durumların doku ve membran düzeyinde tanım ve teşhisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (MANTSCH , 1984; BOYAR ve SEVERCAN, 1997; FUKUYAMA v.d., 1999; SEVERCAN v.d., 2000; LIU v.d., 1996; RAMESH v.d., 2002;; TOYRAN v.d., 2006; DOGAN v.d., 2007; OZEK v.d., 2010; SEVERCAN v.d., 2010; CAKMAK v.d., 2011; CAKMAK v.d., 2012). Bu nedenlerle, projemizde değişik inbred fare ırkları iskelet kas dokularının incelenmesinde ve dokularda meydana gelen değişimlerin tespitinde bu teknik kullanılmıştır.

FTIR spektroskopisi tekniği ile çok çeşitli katı ya da sıvı örnekler hızlı bir şekilde incelenebilir. Örneklerin hazırlanması için gereken süre, seyreltilmiş toplam yansıtma (Attenuated total reflectance, ATR) ataçmanı takılarak minimal süreye indirilebilir ve kısa sürede sonuç elde edilebilen ATR-FTIR spektroskopi yöntemi ile bir örnek için elde edilen spektral çekimlerin sayısı kolaylıkla arttırılabilir. Kızılötesi kaynağından gelen ışının örnek ile teması ile oluşan, ışığın örnek içerisinde toplam iç yansımada meydana gelen değişimleri belirlemek bu ataçmanın temel prensibini oluşturmaktadır (Şekil 1).



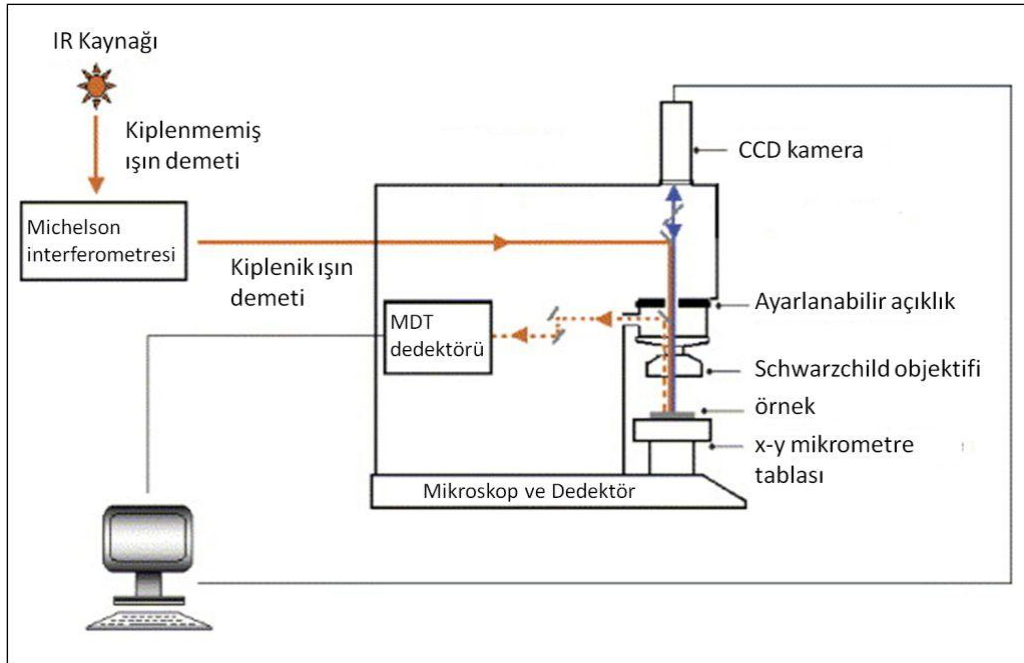
Şekil 1. Çok yansımalı ATR sistemi yapısı (WANG v.d., 2007).

Bir kızılötesi ışın belli bir açı doğrultusunda yüksek refraktif indeksi ile ATR kristali yönlendirilir. Eğer kristalle örnek arasındaki ara yüzeyde geliş açısı, iki yüzey arasında kırılma endeksi fonksiyonu olarak tanımlanan kritik bir açıdan daha fazla ise, toplam iç yansıtma meydana gelir. Bu ataçman kullanımı ile kızılötesi ışınlardan kaynaklı

sinyalin elde edilebilmesi için örnek ile gelen ışının çok yakın bir temasta olması gerekmektedir. Bu nedenle, belirli bir basınç uygulanarak kristal ve örnek arasında yakın temas olması sağlanmaktadır. Örnek infrared spektrumunun bir bölgesinde enerji soğurduğu zaman, geriye kalan radyasyon zayıflatılmış olacaktır. Bu zayıflatılmış radyasyon spektrometre ile tespit edilir ve böylelikle örneğe ait kızıl ötesi spektrumu elde edilmiş olur.

ATR için birçok uygun kristal materyalleri bulunmaktadır. Bu kristaller, Germanyum (Ge), Silika (Si), elmas (Di), ve çinko-selenit (ZnSe) ham maddelerinden oluşabilmektedir. Kullanılan örneğin özelliğine ve incelenmek istenen kızılötesi bölgesine göre kullanılacak kristalin materyali seçilmektedir. Bu çalışmada, orta-IR bölgesinde kullanıma uygun olan, suya dayanıklı, düşük maliyetli Di/ZnSe (elmas/çinko-selenit) kristali kullanılmıştır. Bu kristal, orta-IR bölgesinde kuru, ıslak veya sulu örnekleri analiz etmek için idealdir.

Son yıllarda FTIR spektroskopisi ile kombine edilerek geliştirilmiş olan FTIR mikrospektroskopisi sayesinde ön hazırlık gerektirmeden ve boyama uygulanmadan, çalışılan örneğin kesitindeki ilgili bölge boyunca noktasal spektrumlar ya da organik fonksiyonel grupların dağılımı ve konsantrasyonunu temsil eden kimyasal haritalar elde edilebilir (KIDDER v.d., 1997; KNEIPP v.d., 2002). FTIR mikrospektroskopisi çalışma prensibi Şekil 2’de gösterilmektedir.



Şekil 2. FTIR mikrospektroskopu çalışma prensibi (GAZİ v.d., 2006)

FTIR mikrospektroskopi yönteminin avantajları şöyle sıralanabilir:

FTIR mikrospektroskopi ile toplanan görsel haritalar her bir pikselinde örneğin o bölgesine ait yüksek kaliteli spektrumlar içerir, böylelikle görsel bilgi ile eş zamanlı örneğin belirli bölgesindeki spektrumlar da elde edilebilir.

Analizler için çok küçük miktarlarda örnek kullanımı yeterlidir.

FTIR görüntüleme örnek içindeki makromoleküler titreşimlerin karakteristik absorpsiyonlarına dayandığı için örneklerin, herhangi bir ön işleme tabi tutulmasına, değişik tekniklerle boyanmasına veya işaretlenmesine gerek yoktur. Bu yönüyle FTIR mikrospektroskopi yöntemi örneğe zarar vermeyen bir yöntemdir (KAZARIAN ve CHAN, 2006; KRETLOW v.d., 2008).

Örneklerin kimyasal haritaları yüksek çözünürlükle elde edilir. (JACKSON v.d., 1998).

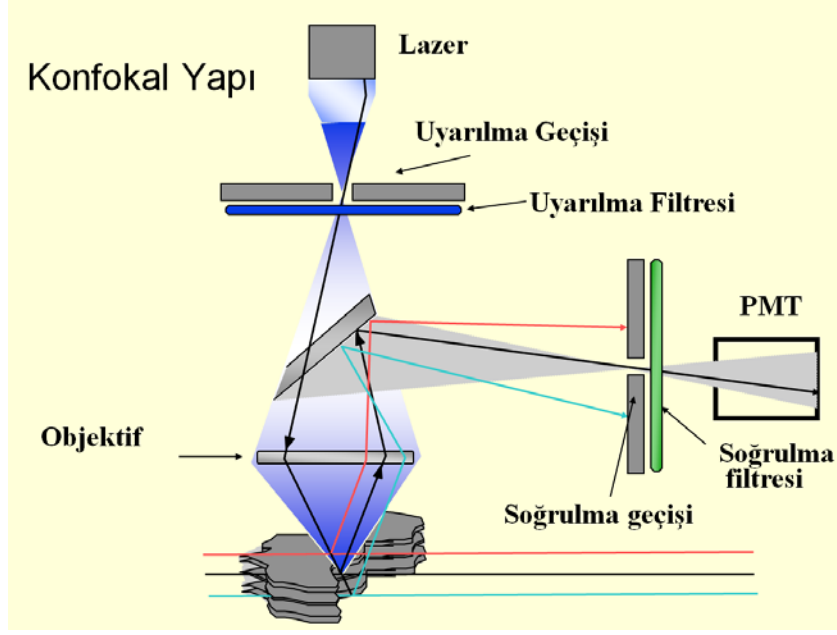
Bu nedenlerle, hastalıkların dokularda neden oldukları patolojileri sistemi bozmadan, etkin ve hassas bir şekilde saptamak ve patolojik bölgeleri FTIR mikrospektroskopisi ile incelemek mümkün olmaktadır (CAMACHO v.d., 1999; FERNANDEZ v.d., 2005; TOYRAN v.d., 2006; KRAFFT ve SERGO, 2006; LIN v.d., 2007; TOYRAN v.d., 2007; BOSKEY ve CAMACHO, 2007; TOYRAN v.d., 2008, CAKMAK v.d., 2012). Bu sayede doku örneklerinden alınan kesitler direk olarak FTIR mikroskopi ile çok daha hassas bir şekilde incelenerek dokuların bütünselliği tahrip edilmeden çeşitli bölgelerindeki değişiklikler araştırılabilmekte ve patolojik bölgeler tespit edilebilmektedir. Bu nedenlerle FTIR mikrospektroskopisi kanser (YANO v.d., 2003; MEYER v.d., 2011), diyabet (TOYRAN v.d., 2006; TOYRAN v.d., 2007, SEVERCAN v.d., 2010; BOZKURT v.d., 2010; BOZKURT v.d., 2012), Alzheimer hastalığı (GRIEBE v.d., 2007; LESKOVJAN v.d., 2010), artirit (BOSKEY ve CAMACHO, 2007) ve kemik hastalıkları (BAYARI v.d., 2007) gibi pek çok hastalığın karakterizasyonu ve moleküler incelenmesinde ayrıca radyasyonun etkilerinin belirlenmesi gibi konularda (CAKMAK v.d., 2012) etkin bir biçimde kullanılmaktadır.

2.4.2 Konfokal mikroskopisi

Floresans mikroskopisinde elektronlar belli dalga boylarındaki ışınların absorbe edilmesi ile üst enerji seviyelerine uyarılırlar. Çok kısa bir süre sonra elektronlar temel

durumlarına geri dönerler ve bu sırada ışın yayarlar. Bu teknik yayılan bu ışının ölçülmesi prensibine dayanır. Temelde iki farklı ışın dalga boyundan, uyarma ve yayılma olarak isimlendirilen iki farklı dalga boyundan bahsedilir. Floresans mikroskopisinin biyolojik çalışmalara uygulaması; incelenecek örneğin florofor adı verilen floresan işaretleyicilerle işaretlenmesi esasına dayanır.

Konfokal mikroskopisi, bir mikroskobik görüntünün optik çözünürlüğünü ve görünürlüğünü arttırmak amacı ile noktasal ışıklandırma kullanılan bir görüntüleme tekniğidir. Konfokal prensip, noktasal bir ışık kaynağına ait görüntünün, bir delikli levha ile süzülerek sadece odak düzlemindeki kısmının görüntülenmesi esasına dayanmaktadır (PURALI, 2008). Şekil 3’de görüleceği üzere kullanılan ışık kaynağı bir lazerdir. Kondensörden geçen ışık dikronik aynadan geçer ve objektif üzerinden örneğe yönelir. Lazer ışığı fluoresan işaretli örneği geçerken yol boyunca tüm fluoresan molekülleri uyarır. Uyarılan moleküllerden her yönde yayılan fluoresan emisyon çıkar. Odak planındaki fluoroforlardan kaynaklanan emisyon geometrik optiğinin kurallarına uygun olarak objektif tarafından toplanır. Emisyon dalga boyu daha uzun olduğundan dikroik aynadan yansımaktır. Yansıyan ışığın karşısına ortasında küçük bir delik (pinhole) olan bir plaka konur. Odaktan kaynaklanan emisyon yayılım geometrisi nedeniyle tam deliğe denk geldiğinden foton çoğaltıcı tüpe (photomultiplier tube) ulaşır enerjisini verir ve emisyon bu şekilde kayıt edilmiş olur. Buna karşın odak planının altından ve üstünden kaynaklanan emisyon yayılımları ise deliğe değil plakaya çarptığı için kayıt olmazlar. Böylelikle sadece tek bir plandan ve sadece odaklanan düzlemden kayıt alınmış olur. Konfokal mikroskobun avantajı tek bir plandan gelen ışığı toplayabilmesidir.



Şekil 3. Konfokal mikroskop çalışma prensibi (PURALI, 2008).

Bu görüntüleme tekniği, elde edilen görüntülerin üç boyutlu yapılarının belirlenmesini mümkün hale getirir. Bu teknik bilim ve endüstride son zamanlarda özellikle biyolojik bilimlerde, yarı iletken incelemesi ve materyal biliminde önem kazanmıştır. Bu teknoloji araştırmacılara ulaşılabilecek en yüksek ışık mikroskobu çözünürlüğü ile hücre altı yapılarının bile görüntülenebilmesini, bu yapıların fonksiyonlarının araştırılabilmesini sağlar.

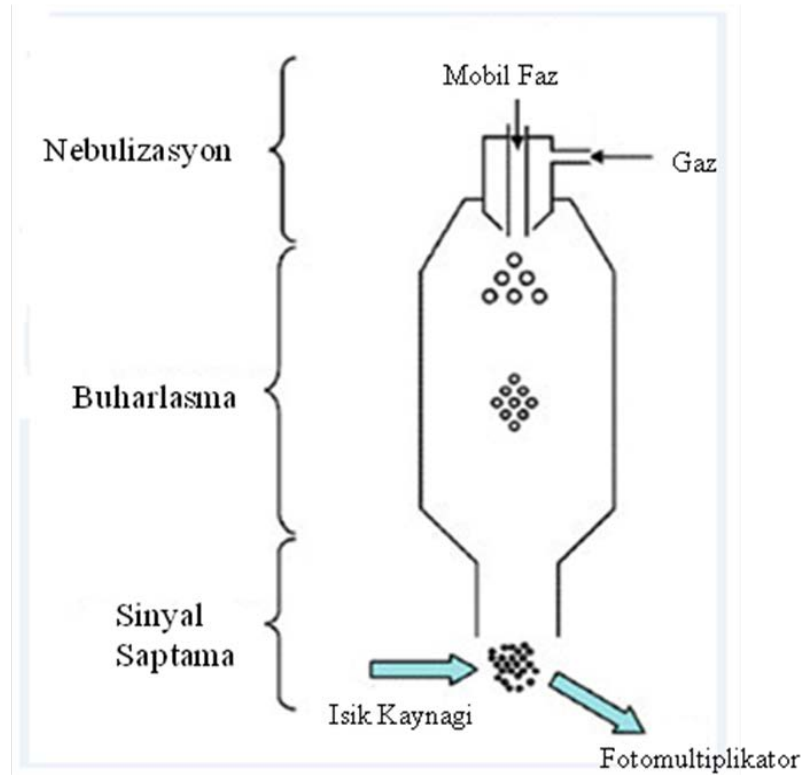
2.4.3.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), bir karışımın içindeki maddeleri saf bir halde ayırmak ve nitel ve nicel olarak tanımlamak için kullanılan ve bu ayırım için yüksek basınç kullanan bir kromatografi tekniğidir. HPLC tekniğinde farklı durağan faz çeşitlerine sahip kolonlar kullanılır. Ayırıştırılmak istenilen madde yüksek basınçla bu kolondan geçirilir ve bir dedektör yardımıyla sinyal alınır. HPLC kullanarak bir maddenin tutulma süresi belirlenebilir ve gözlenen tutulma süresi bahsedilen maddeye özgüdür. Ayrıca, maddenin verdiği bant alanı maddenin miktarıyla doğru orantılıdır.

HPLC enstrümanı ile ayırımı yapılacak maddelerin farklı özelliklerinden dolayı, çeşitli durağan fazlar geliştirilmiştir. Bahsedilen durağan fazlar arasında, ters; normal; iyon değişimi; jel filtrasyon ve displasman kromatografisi gibi farklı, incelenecek olan moleküllerin polaritesine, yük durumuna ve boyutuna göre kullanılan sistemler mevcuttur (CHRISTIE, 1987).

HPLC'nin bir maddeyi tanımlayabilmesi için, uygun dedektöre ihtiyacı vardır. Ayırıştırılmak istenilen moleküllerin özelliklerine göre Mor Ötesi (UV) dedektörleri, Kırılma İndeksi (RI) dedektörleri, ve Evaporatif Işık Saçılım (ELS) dedektörleri gibi farklı, incelenecek olan moleküllerin, sırasıyla ışığı soğurmasına, ışığı kırmasına, ve ışığı saçmasına göre değişen dedektörler geliştirilmiştir (CHRISTIE, 1992).

Projede uygulanan HPLC çalışmalarında seçilen kolon, durağan fazı normal faz olan silika dolgu maddeli bir kolon olup, molekülü tanımlayacak olan dedektör ise ELS dedektörüdür. Normal fazlı kolonların kullanıldığı HPLC deneylerinde, durağan faz polar olduğu için, mobil fazın apolar olması gerekmektedir. ELS dedektörleri, mobil faz ve örnekten oluşan karışım, enstrümanın içinden geçerken, buharlaşmayan kısmın saçtığı ışık miktarını ölçer. Buharlaşmayan ya da yok olmayan her molekül sinyal verir. Saçılan ışık sinyali ise, incelenecek olan molekülün miktarını gösterir. ELS dedektörlerinin çalışma prensibi üç ana aşamaya dayanır: nebulizasyon, buharlaşma ve sinyali saptama (Şekil 4.).



Şekil 4. ELS dedektörlerinin çalışma prensibi (<http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/19182-Optimizing-the-Sensitivity-of-an-Evaporative-Light-Scattering-Detector/>).

ELS dedektörlerinde veri hesaplanması sırasında, kullanılan standartların kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi esastır. İkincil dereceden hesaplanacak olan bir

kalibrasyon eğrisi için, en az üç nokta, yani en az üç farklı konsantrasyonda ya da miktarda standart gerekmektedir ve eğri aşağıdaki denklemlerle hesaplanmaktadır (Empower 2 Data Acquisition and Processing Theory Guide):

$$y = A + Bx + Cx^2$$

y : Yazılım tarafından hesaplanan standart bantının verdiği sonuç

x : Bileşenin verdiği miktar ya da konsantrasyon

A , B , ve C : Bant eğrisinin polinom katsayıları

Bileşen miktarını ya da konsantrasyonunu hesaplamak için ise aşağıdaki denklem kullanılmaktadır:

$$x = \frac{-B \pm \sqrt{B^2 - 4C(A - y)}}{2C}$$

Kalibrasyon eğrileri çizilirken, önemli olan bir diğer nokta da, standart eğrilerinin belirleme katsayısı (coefficient of determination) olan R^2 'nin tayinidir. Uygun sınır değerler içerisinde bulunan bir belirleme katsayısı, kalibrasyonun uyum iyiliğini göz önüne sermektedir. Bu katsayı aşağıdaki denklemlerle hesaplanır (Empower 2 Data Acquisition and Processing Theory Guide):

$$R^2 = 1 - \frac{(S_y)^2}{\sigma_y^2}$$

R^2 = Belirleme katsayısı

S_y = Bileşenin verdiği miktar ya da konsantrasyonun, yazılım tarafından hesaplanan standart bantının verdiği sonuçtaki standart yanılma

σ_y^2 = Standart dağılımı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan modelleri

Projemizde kullanılan fare modelleri projenin Alman ortağı Prof. Dr. Gudrun Brockmann'ın grubu tarafından Berlin Humboldt Üniversitesi'nde yetiştirilmiş ve iskelet

kas dokuları tarafımıza gönderilmiştir. Projede yüksek kas kütlesine sahip olmalarına göre seçilerek geliştirilmiş olan 3 değişik BMMI (BMMI806, BMMI866 ve BMMI826) ırkı ve yüksek yağ içeriğine göre seçilerek geliştirilmiş olan 4 değişik BFMI (BFMI852, BFMI856, BFMI860 ve BFMI861) ırkı ile kontrol C57B6J ve DBA/2J ırklarının LD ve Q kas dokuları incelenmiştir.

İncelenen BFMI ve BMMI ırkları sırası ile yüksek yağ içeriğine sahip olma ve yüksek kas içeriğine sahip olma durumlarına göre seçilerek inbred olarak üretilmektedirler. Bu fare modelleri obezite oluşumu ve kas gelişiminin obeziteye etkileri üzerinde rol oynayan yeni genlerin bulunması amacıyla yapılan çalışmalara ışık tutmaktadırlar. Kısaca, kullanılan BFMI ırkları, öncelikle vücutlarındaki protein içeriğinin az olmasına ve daha sonra vücut yağ içeriğinin fazla olmasına göre seçilerek 58 jenerasyonluk üretim süreci sonunda ayrılmıştır. BMMI ırkları ise, öncelikle vücutlarındaki protein içeriğinin yüksek olmasına ve daha sonra vücut yağ içeriğinin düşük fakat vücut ağırlığının yüksek olmasına göre seçilerek yine 58 jenerasyonluk üretim süreci sonunda ayrılmıştır. Ayrılan bu ırklar daha sonrasında inbred olarak çiftleştirilerek projede kullanılan BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861 ve BMMI806, BMMI826, BMMI866 ırkları oluşturulmuştur (Wagener et al 2006, Meyer et al 2009). Kullanılan kontrol ırklarından DBA/2J yüksek içerikli yağ diyeti ile beslendiğinde, bu diyete daha kuvvetli bir cevap verirken C57BL/6J yüksek yağ içerikli diyete az cevap vermektedir (SVENSON v.d., 2007).

3.2. Hayvan deneyleri

Projede kullanılan fare modellerinin yetiştirme, barındırma ve bu farelerin vücut ağırlıklarının izlenmesi ile tüm serum parametreleri ölçümleri projenin Alman ortağı Prof. Dr. Gudrun Brockmann'ın Humboldt Üniversitesi bünyesindeki laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tüm gruplar için grup başına 6 adet fare yetiştirilmiştir.

Hayvanlar 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde 22 ± 2 °C oda sıcaklığında ve %65 nemlilikte yiyecek ve suya istedikleri zaman ulaşabilecek şekilde barındırılmıştır. Tüm fare ırkları 20 hafta boyunca standart beslenme diyeti (SBD) ile beslenmiştir. Ayrıca bu gruplara ek olarak, BFMI ırklarına yüksek yağ içeren diyet (HFD) de 20 hafta boyunca verilmiştir. Başka bir deyişle, çalışmada kullanılan kontrol grupları ile BMMI ırkları sadece SBD ile beslenmiş, BFMI ırkları ise hem SBD hem de HFD ile beslenmiştir. Kullanılan SBD (V1534-000, ssniff R/M-H, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest/Almanya)

büyük çoğunluğu %58 oranında karbonhidratlardan, %33 proteinler ve %9 oranında yağ (soya yağı) oluşmaktadır ve verilen besin toplam 12.8 MJ/kg metabolize edilebilir enerji içermektedir. Buna ilaveten büyük çoğunluğu yağlardan oluşan (%45 yağ, %24 protein, %31 karbonhidrat) HFD (S8074-E010 ssniff EF R/M; ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest/Almanya) toplam 19.1 MJ/kg metabolize edilebilir enerji içermektedir ve içeriğindeki yağ ağırlıklı olarak hindistan cevizi yağı ve iç yağıdır.

Farelerin vücut ağırlıkları düzenli aralıklarla ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Farelerin fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için bazı serum parametreleri ölçümü de yapılmıştır. Fareler 20 haftalık olduklarında 2 saat aç bırakıldıktan sonra kan örnekleri toplanmış ve bu örneklerden kan serumu toplanmıştır. Bu serumlar kullanılarak 2 saat aç kalmış farelerin serum kolesterol, esterifiye olmamış yağ asidi (NEFA), trigliserit, leptin ve adiponektin seviyeleri ile kan glikoz ve insülin seviyeleri ölçülmüştür. Buna ilaveten 10 ve 20 haftalık fareler intraperitoneal insülin tolerans testi (ipITT) uygulanarak insülin duyarlılıkları ölçülmüştür. Bu ölçümler için fareler 2 saat aç bırakıldıktan sonra vücut ağırlıklarına göre 0.01 ml/gr oranında 0.1U/ml insülin (Humanalog, Lilly) intraperitoneal olarak enjekte edilmiş, bu enjeksiyondan önce (0) ve 15, 30 ve 60 dakika sonrasında serum glikoz miktarları ölçülmüştür (Bayer Contour Plasma [mg/dl]). 20 haftalık olan fareler, dekapitasyon öncesi 2 saat aç bırakılmış, bu süre sonunda serum parametrelerinin ölçümü için kan alınmış, ardından ipITT testi gerçekleştirilmiş ve hayvanlar dekapite edilerek LD ve Q kasları disekte edilip çıkarılmıştır.

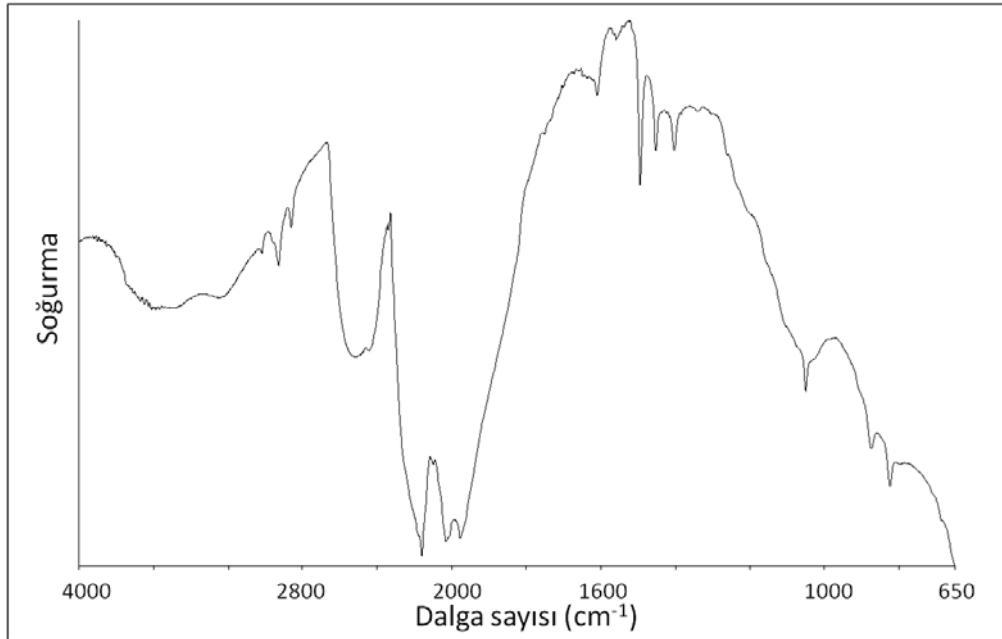
ATR-FTIR spektroskopisi deneyleri ve HPLC çalışmaları için kullanılacak olan kas dokuları hayvanlar dekapite edildikten sonra sıvı nitrojen içerisinde şok dondurma ile dondurulup -80°C'de saklanmıştır. FTIR mikrospektroskopisi ve konfokal mikroskopisi ile incelenecek olan kasların histolojisinde sıvı nitrojen içerisinde ani dondurmadan kaynaklanan büzülme ve donma etkisi ile oluşan hasarın önlenmesi için LD ve Q kas iskelet kası örnekleri sıvı nitrojen içerisinde soğutulmuş izopentan içerisinde dondurularak hazırlanmıştır. Ayrılan kaslar enine kesit alınabilecek düzlemde ayarlanarak küçük bir destek tahtasının üzerine yerleştirilen bir parça özel kesit alma matriksi üzerine yerleştirilmiş ve bu destek ile birlikte doku, önceden sıvı nitrojen içerisinde soğutulmuş (sıvı nitrojen içerisinde dondurulduktan sonra tamamıyla değil ama biraz erimesi sağlanmış) izopentan içerisine batırılmak suretiyle dondurulup uygun saklama kabı içerisine yerleştirilerek -80°C'de saklanmıştır. Örnek taşınması sırasında ve deneylerden önce örneklerin tekrar tekrar dondurulup çözünmesinden kaçınılmıştır.

3.3. ATR-FTIR spektroskopisi

3.3.1. Spektral verilerinin toplanması

İskelet kas örnekleri hiçbir ön işlem yapılmadan ATR ünitesinin elmas/çinko-selenit (Diamont/ZnSe) kristali üzerine yerleştirilerek ATR-FTIR spektroskopisi ile 4 cm^{-1} çözünürlüğün ve 50 çekim sayısı kullanılarak incelendi. Çekimler $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında Perkin Elmer Spektrum100 FTIR Spektrometresi kullanılarak gerçekleştirildi. Her iki kasta da her bir bireye ait örneklerden 3 ayrı parça kas dokusunun ATR-FTIR spektrumları elde edildi (3 ayrı replike çekimi). Bu replike spektrumların ortalamaları detaylı analizler için kullanıldı.

Atmosferdeki CO_2 ve H_2O 'dan kaynaklanan soğurma bantları, araştırılan doku örneğinin soğurma bantlarını kamufle edebilir. Dolayısıyla, bu atmosferik su buharının etkisini azaltmak amacıyla FTIR spektrometresinden sürekli kuru hava geçirilmektedir. Buna ek olarak, örnek çekimi öncesinde havanın çekimi yapılmakta ve elde edilen spektrum bilgisayar programı aracılığıyla örnek spektrumundan matematiksel olarak çıkarılmaktadır. Sözü edilen hava spektrumu Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5. Atmosferik havanın $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki ATR-FTIR spektrumu.

3.3.2. ATR-FTIR spektroskopik çalışmalarında kullanılan spektrum analiz yöntemleri

BFM ve BMM ırkları spektrumlarına ait bant alanlarının ve bant frekans değerlerinin tayinini içeren detaylı spektral analizler, örnekler üzerinde herhangi bir su çıkarma işlemi uygulanmadan normalize edilmemiş ham spektrumlar kullanılarak Perkin Elmer Spektrum One analiz programı ile yapıldı. FTIR spektrumunda yer alan bandlardan pek çok bilgi elde edilebilir. Değişik bölgelerdeki bandlardaki frekans kaymaları ve sinyal şiddetlerindeki ve/veya alanlarındaki değişimler, sistemdeki çeşitli fizikokimyasal süreçler hakkında bilgi elde etmede kullanılır. Sinyal şiddeti ve/veya alan değerinin artması, adı geçen grubun konsantrasyonunun artması; azalması da o grubun konsantrasyonunun azalması anlamına gelmektedir (ALO v.d., 1998; FREIFELDER v.d., 1982). Membran hakkında yapısal bilgi veren parametreler düzen (order), ve düzensizlik (disorder), parametreleridir. Bu parametreler FTIR analizinde CH₂ gerilme modu frekans (veya dalgasayısı) değerindeki değişim ile monitör edilir (CASAL ve MANTSCH, 1984, CAMERON ve CHARETTE, 1981).

3.4. FTIR mikrospektroskopik çalışmaları

İskelet kas dokularından soğutmalı mikrotom kullanılarak 10 µm kalınlığında enine seri kesitler alındı. Bu kesitlerden ilki kızılötesi ışığı geçiren özel BaF₂ camları üzerine yerleştirildi ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. FTIR mikrospektroskopisi çalışmalarında Perkin Elmer Spotlight 400 mikrospektroskopi sistemi kullanıldı. Kesitlerden 4000-750 cm⁻¹ frekans aralığında, 6.25x6.25 µm piksel büyüklüğü ve 8 cm⁻¹ spektral çözünürlük kullanılarak her pikselde 4 spektrumun ortalaması alınarak spektral haritalar toplandı. Her kesitten beşer spektral harita toplandı. İkinci seri kesitler ise histolojik tanımlama için hematoksilin ve eozin boyamasına tabi tutuldu. Bu boyamaların sonuçları FTIR mikrospektroskopisi öncesinde kesitlerin histolojik yapısının görülmesi amacıyla kullanıldı.

Elde edilen spektral haritalar Isis 3.0 (Spektral Dimensions, USA) görüntü analiz programı kullanılarak incelendi. Spektral haritalardaki spektrumlar öncelikle bir taban çizgisine oturtuldu. Kesitlerdeki olası kalınlık farklılıklarından kaynaklanabilecek yanlış ölçümlerden kaçınılması için bant alan oranları alınarak görüntüleme çalışmaları gerçekleştirildi. Elde edilen spektral haritalarda Tablo 1’de verilen bölgeler kullanılarak bant alanları hesaplandı, bu bant alanları kullanılarak Tablo 2’de verilen bant alan oranları görüntülendi.

Tablo 1. Spektral haritalarda gerçekleştirilen bant alanı hesaplamaları için kullanılan bölgeler.

Kızılötesi soğurma bandı	Kullanılan spektral bölge
CH gerilim bölgesi	2942-2906 cm^{-1}
Olefinik (HC=CH)	3028-3000 cm^{-1}
CH ₂ antisimetrik gerilim	2942-2906 cm^{-1}
CH ₃ antisimetrik gerilim	2980-2948 cm^{-1}
Amid I	1700-1600 cm^{-1}
Karbonil (C=O) gerilim	1760-1724 cm^{-1}
1047 cm^{-1} bandı (glikojen)	1056-1020 cm^{-1}
1240 cm^{-1} bandı (proteoglikanların sülfat gerilim ve kolajenin Amid III titreşimleri)	1265-1210 cm^{-1}

Tablo 2’de görüldüğü gibi iskelet kas kesitlerinde lipit/protein dağılımı (CH/amid I), lipitlerin içerisindeki metil grubu dağılımı (CH₃ anti./CH), lipitlerin içerisindeki metilen gruplarının dağılımı (CH₂ anti./CH), lipitlerin zincir uzunluklarının dağılımı (CH₂ anti./CH₃ anti.), lipitlerin içeriğindeki karbonil miktarı dağılımı (C=O/CH), doymamış lipit miktarının doymuş lipit miktarına göre dağılımı (olefinik/CH₂ anti.) görüntüledi. Kesitlerde mevcut olan glikojen dağılımı ise 1047 cm^{-1} ’de bulunan glikojenden kaynaklı bant alanının proteoglikanların sülfat gerilim ve kolajenin Amid III titreşimlerinden kaynaklanan ve gruplar arası anlamlı bir değişim göstermeyen 1240 cm^{-1} ’de yer alan bant alanına oranlanarak hesaplandı. Elde edilen spektral haritalar aynı soğurma derecesinde (scale) çizdirilerek gruplar arasında hesaplanan bu oranlar arasındaki değişimler karşılaştırıldı.

Tablo 2. Spektral haritalarda görüntülenen bant alan oranları

Hesaplanan bant alan oranı	Açıklama
Lipit/protein	CH gerilim bölge alanı/amid I bant alanı
Lipit içeriğindeki metilen grubu miktarı	CH ₂ antisimetrik gerilim bant alanı/CH gerilim bölge alanı
Lipit içeriğindeki metil grubu miktarı	CH ₃ antisimetrik gerilim bant alanı/CH gerilim bölge alanı
Lipit içeriğindeki karbonil grubu miktarı	Karbonil (C=O) gerilim bant alanı/CH gerilim bölge alanı
Doymamış lipit içeriğinin doymuş lipit içeriğine oranı	Olefinik (HC=CH) bant alanı/CH ₂ antisimetrik gerilim bant alanı
Lipit hidrokarbon zincir uzunluğu	CH ₂ antisimetrik gerilim bant alanı/ CH ₃ antisimetrik gerilim bant alanı
Glikojen dağılımı	1047 cm^{-1} bant alanı/1240 cm^{-1} bant alanı

3.5. Konfokal mikroskopisi

3.5.1 Konfokal mikroskopisi deneyleri için gerçekleştirilen immünohistokimyasal boyamalar

İskelet kaslarından soğutmalı değirmen yardımı ile -25°C 'de $6\mu\text{m}$ kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitler normal bi lam üzerine alındı ve kesitler boyama işlemine kadar -20°C 'de saklandı. Kullanımdan önce oda sıcaklığına getirilen kesitler 10 dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Boyamalar sırasında rutin olarak kullanılan immunohistokimyasal boyama prosedürü takip edildi. Prosedürde immünoflorosans ile birlikte nötral lipit boyası ile lipit içeriğini boyamaya yönelik bir metot kullanıldı (SHAW v.d., 2009). İskelet kasları içerisinde yer alan lipitler iletişimde olduğumuz bir grup tarafından tarafımıza temin edilen ve yeni geliştirilen bir nötral lipit boyası olan LD540 ile boyandı (SPANDL v.d., 2009).

İncelenecek olan BMM ve BFM ırkları iskelet kaslarında hangi kas lifi tipinde daha fazla lipit depolandığını belirleyebilmek için iki farklı seri kesit alındı. Bu kesitlerden ilkinin lipit içeriği görüntülemesi için LD540 ile, diğerinin ise kas lifi tiplerinin belirlenebilmesi için kas lifi tipi antبادileri ile boyanmasına karar verildi. Lipit boyası ile boyanan kesitten veri analizi için konfokal mikroskopisi ile görüntü toplanan bölge, kas lifi tipi boyaması yapılan diğer seri kesit üzerinde bulundu, böylelikle kas lifi tipi belirlenmesi teyit edilip hangi kas tipi lifinde ne kadar lipit içeriği olduğu hesaplandı. Farklı lamalar üzerine alınan seri kesitlerden biri üzerine kas lifi tipinin belirlenmesi amacıyla yavaş kasılan (tip I) ve oksidatif özelliklere de sahip olmasına karşın hızlı kasılan (tip IIa) kas lifi tiplerine özgü miyozin ağır zinciri (MHC) antikorları uygulandı. İki seri kesit üzerinde aynı bölgeyi bulmayı kolaylaştırmak amacıyla, LD540 boyamasının yapılacağı kesitte tip IIa kas lifi tipine özgü MHC antبادisinin de uygulanması kararlaştırıldı.

- Kas lifi tipi görüntülemesi için kesitler tip I lifi birincil antبادisi (mouse anti-myosin for human slow fibres, A4.840, Developmental Studies Hybridoma Bank of Iowa University) ve tip IIa lifi birincil antبادisi (mouse anti-myosin for human human neonatal slow and fast IIa fibers, N2.261, Developmental Studies Hybridoma Bank of Iowa University) ile boyandıktan sonra tip I ve tip IIa liflerinin görüntülenebilmesi için sırasıyla Alexa Fluor GAMIgM 594 ve Alexa Fluor GAMIgG_{1γ} 488 ikincil antبادileri uygulandı. Böylelikle tip IIa kas liflerine ait sinyalin Argon lazer ile 488 nm dalga boyunda illümüne edilen (yeşil) kanallardan elde edilmesi sağlanmıştır. LD540 boyaması ile elde edilen sinyaller ise Helyum-

Neon lazer ile 543 nm dalga boyunda illimüne edilen (kırmızı) kanalda görüntülenmiştir.

- Yeni geliştirilen güçlü bir nötral lipit boyası olan LD540 konsantrasyonu 10µg/ml olacak şekilde %100'lük etanol içerisinde çözülerek stok solüsyonu hazırlandı. Boya ışığa duyarlı olduğu için stok solüsyonu hazırlanan ependorflar ve bu ependorfların saklandığı kap aliminyum folyo ile kaplanarak -20 °C derecede muhafaza edildi. Kullanım öncesinde LD540 çalışma solüsyonu, stok solüsyonu 1:1000 oranında PBS ile seyreltilerek hazırlandı. Kesit üzerine uygulandıktan sonra bu solüsyon bekletilmeden atıldı.

Uygulanan prosedüre göre,

- Kesitler 1 saat süresince %3.7'lik formaldehit (PBS içerisinde hazırlanmış) içerisinde bekletilerek fikse edildi.
- Daha sonrasında 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanandı.
- Etrafları kurularak nemli kalmalarını sağlamak için yatay olarak alt iç çeperine ıslatılmış mendil konulan lam kapları içerisine yerleştirildi, kesitlerin etrafı hidrofobik kalem ile çizildi, böylelikle boyaların ve antibadilerin daha az miktarda kullanılması sağlanmış oldu.
- Daha sonrasında kas lifi tipini belirlemek için kullanılan birincil antibadiler (1:100) kesit üzerine uygulanarak 1 saat inkübe edildi. Kas lifi görüntülemek için kullanılan kesitlere tip I ve tip IIa MHC antibadileri, lipit içeriğini görüntülemek için kullanılan kesitlere sadece tip IIa MHC antibadisi uygulandı.
- Kesitler 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Tekrar etrafları kurularak lam kabı içerisine yatay olarak yerleştirildi.
- Kas lifi tipi görüntülemesi için kullanılan ikincil antibadiler (1:25) uygulanarak 30 dakika inkübe edildi. Kas lifi görüntülemek için kullanılan kesitlere Alexa Fluor GAMiG_M 594 ve Alexa Fluor GAMiG_{1γ} 488 ikincil antibadileri birlikte uygulanırken lipit içeriğini görüntülemek için kullanılan kesitlere sadece Alexa Fluor GAMiG_{1γ} 488 ikincil antibadisi uygulandı.
- Kesitler 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.
- Daha sonrasında sadece lipit içeriğini görüntülemek için boyanan kesitler üzerine hazırlanan LD540 çalışma solüsyonu (1:1000 oranında PBS ile seyreltilmiş) karanlık odada kesitler üzerine uygulandı ve 20 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.

- Kas lifi tipi boyaması için hazırlanan lam PBS ile yıkandıktan sonra moviol ile kapatma işlemine geçildi.
- LD540 uygulanması sonunda kesitler 3 dakika PBS ile yıkandı.
- Kesitlerin üzeri yine karanlık odada moviol ile kaplanarak lamlar lamel ile kapatıldı.

3.5.2. Konfokal mikroskopisi veri toplanması ve analizi

Boyamalar yapıldıktan sonra kas lifi görüntülemesi için hazırlanan kesitler 20x 0.75 NA objektife sahip olan Nikon E600 floresan mikroskobu ile görüntülendi. Alexa Fluor GAMiG_M 594 Texas red (540-580 nm) eksitasyon filtresi ile incelenirken Alexa Fluor GAMiG_{G_{1γ}} 488 FITC (465-495) eksitasyon filtresi ile incelendi. Floresan mikroskop görüntüleri CCD kamera ile toplandı ve seri kesitlerin lipit içeriği incelenen bölgelerindeki kas lifi tiplerinin kesinleştirilmesinde kullanıldı.

Lipit içeriğinin incelenmesi için hazırlanan lamlar Leica DMIRE2 (Leica Microsystems) konfokal mikroskobu ile 40x 1.4 NA yağ kullanılan objektif kullanılarak görüntülendi. Piksel büyüklüğü 1.024x1.024 µm ve pinhole 1 hava ünitesi olacak şekilde ayarlandı. Bu inceleme sırasında Alexa Fluor GAMiG_{G_{1γ}} 488 Argon lazer ile 488 nm'de illumine edilirken LD540 Helyum-Neon lazer ile 543 nm dalga boyunda illumine edilerek görüntülendi. Elde edilen görüntüler Image-Pro Plus 5.1 (Media Cybernetics, MD, USA) programı kullanılarak analiz edildi. Kas lifi içeriğindeki lipitler (intramyocellular lipids, IMCL) programda her grup için eşit treshold uygulanarak hesaplandı. Hesaplanan IMCL miktar sonuçları toplam hücre alanına oranlanarak rapor edildi.

Deneyle sırasında spesifik olmayan boya bağlanması sonucu kesitte oluşabilecek arka plan boyanmasının tespiti için negatif kontrol görüntülemeleri yapıldı. Bu görüntülemelerde boya yerine PBS konularak boya uygulama süresi boyunca bekletildi ve aynı şekilde yıkanarak aynı koşullarda görüntülendi, fare iskelet kası kesitlerinde böyle bir arka plan ışması gözlenmedi.

3.6. HPLC-ELSD Çalışmaları

Bu projede, Berlin lipit inbred (BFMI) ve Berlin kas inbred (BMMI) fare modellerinin longissimus dorsi (LD) ve kuadriseps (Q) kas dokularında, obeziteye bağlı

lipit çeşitlerini ve bu lipitlerin miktarlarındaki farklılıkları belirlemek amacıyla HPLC-ELSD (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – Evaporatif Işık Saçılım Dedektörü) tekniği kullanıldı. Optimizasyon aşamasında literatüre göre denenen metotların yeterli olmadığı anlaşıldı (PERONA ve RUIZ-GUTIERREZ, 2005, DESCALZO v.d., 2003). HPLC-ELSD deneyleri için halen kullanılmakta olan en son metot, çakışan lipit bantlarını ayıştıracak şekilde ve yeni lipit bantları elde edecek şekilde geliştirildi ve lipitlerin tayini bu metotla yapıldı (OLSSON v.d., 2011, RESTUCCIA v.d., 2011). Klasik Folch metodu geliştirildi ve lipitlerin tayini bu yeni metotla yapıldı.

3.6.1. Lipit Ekstraksiyonu:

Önceki rapor dönemlerinde de belirtildiği gibi, HPLC-ELSD deneylerinde kullanılacak olan DBA/J2 ve C57BL/6J kontrol fare ırklarının; BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861 obez inbred fare ırklarının ve BMMI806, BMMI826 ve BMMI866 kas inbred fare ırklarının LD ve Q kas dokularından lipit ekstraksiyonuna başlanmadan önce, en etkili lipit ekstraksiyon metotları araştırıldı. Denenen farklı metotlar arasında, en efektif protokol olan klasik Folch metodunun, lipit ekstraksiyon metodu olarak kullanılmasına karar verildi (FOLCH, 1957; IVERSON 2001). Özetle, kas dokusu kloroform ve metanol kullanılarak (2:1, v/v), son hacmi kullanılan kas dokusunun yirmi katı olacak şekilde ULTRA-TURRAX T25 cihazı ile bir dakika boyunca homojenize edildi. Elde edilen homojenat kırk dakika boyunca orbital çalkalayıcı kullanılarak karıştırıldı. Daha sonra, homojenatta kalabilecek olan herhangi bir katı maddeyi bertaraf edebilmek için, santrifujde 2000 rpm hızında beş dakika boyunca santrifüjlendi. Katı fazından arınan homojenatın içine daha sonra 0.9%’ luk NaCl solüsyonu katıldı. Elde edilen karışım, oda sıcaklığında on dakika boyunca 2500 rpm’ de santrifüjlendi. Santrifüj sonucunda oluşan iki katmanlı fazın, alt katmanı HPLC-ELSD deneyleri için toplanırken, üst katman fazı içinde lipit kalması ihtimaline karşı, toplanıp üzerine kloroform ve metanol eklenerek bir kere daha 2500 rpm’ de santrifüjlendi. Böylece, ilk santrifüjden elde edilen üst fazda kalan lipitler geri kazanıldı. Lipitlerin, kullanılan deney tüpünün çeperine yapışması için, örnekler azot gazıyla kurutuldu. Örnekler, deneylerde kullanılana kadar – 20°C’de saklandı.

DBA/J2 ve C57BL/6J kontrol fare ırklarının; BFMI852, BFMI856, BFMI860, BFMI861 inbred fare ırklarının ve BMMI806, BMMI826 ve BMMI866 inbred fare ırklarının LD ve Q iskelet kas dokularındaki lipitler yukarıda anlatılan metoda uygun olarak ekstrakt edildi. Iskelet kas doku örneklerinin az miktarda olması sebebiyle, her bir

dokudan 29.2 ± 0.8 mg kadar kesilip tartıldı. Daha sonra bu dokular, yukarıda anlatıldığı gibi, son hacmi kesilen kas dokusunun yirmi katı olacak şekilde kloroform ve metanol çözücülerinin içine konuldu.

3.6.2.HPLC-ELSD Deneyleri:

HPLC-ELSD deneyleri, Waters Alliance HPLC e2695 Separations Module enstrümanı ve Waters 2424 ELS dedektörü kullanılarak yapıldı. Analizlerde Agilent Polaris-Si marka silika dolgulu (150 x 4.6 mm, 3 µm partikül büyüklüğü) kolon kullanıldı. Deneylere başlanmadan önce, kullanılan kolon, mobil çözücüler ile kolonun boyutu ve dolgu materyalinin partikül büyüklüğüne bağlı olarak 35 dakika kadar yıkandı (<http://www.nestgrp.com/pdf/colcare.pdf>). HPLC deneylerinde esas olan kolon şartlandırılması ise, kullanılan metodun süresi göz önüne alınarak, her defasında dörtten az olmamak koşuluyla gerçekleştirildi.

Optimizasyon aşamasında, denenen metotların yeterli olmadığı anlaşıldı ve tutulma süreleri birbirine çok yakın olduğu için ayrılmayan, kullanılan çözücülerin özelliğinden dolayı bir arada çıkan lipitleri ayıracak ve çözünürlüğü arttıracak kendine has yeni bir metot geliştirildi. Kolon ve örnek odacıklarının, ve dedektörün sıcaklığının değiştirilmesi, gaz akışının hızlandırılması ve çözücülere trietilamin ve asetik asitin eklenmesiyle optimizasyon aşamasında denenen bütün metotlardan daha iyi sonuç elde edildi. Bu metotla, polarite değerleri ve molekül ağırlıkları birbirine yakın olan kolesteril oleat, gliseril trioleat, kolesterol ya da 1-oleoil-rak-gliserol gibi lipitlerin birbirinden ayrımı başarıyla gerçekleştirildi. Ayrıca, kromatogramların fosfalipit bölgesindeki düşük çözünürlüğü de, bu yeni metotla bertaraf edildi.

Deneylerde, standartların ve örneklerin yürütüldüğü sıcaklık 25°C' olup, kolon sıcaklığı 22°C' ye sabitlendi. İkili gradyan akışın olduğu bir metotla en efektif ayırım yapıldı: çözücü A, n-hekzan; çözücü B, izopropanol, metanol, asetik asit ve trietilaminden (60:40:0.2:0.1, wt) oluşturuldu. Bu iki çözücü zamana bağlı olarak farklı gradyantlarda kullanıldı (**Tablo 3**). Mobil çözücülerin total akış hızı 0.8 ml/dk olarak ayarlandı. ELS dedektörünün, nebulizör parametresi soğutma moduna ayarlandı. Dedektörün sıcaklığı 70°C olup, dedektöre gelen gaz akış hızı ise, 60 psi (4.13 bar) olarak ayarlandı.

Tablo 3. HPLC deneylerinde kullanılan mobil fazların akış hızı ve zamana bağlı gradyanları.

SÜRE (Dk.)	DEBİ (ml/dk)	A – n-Hekzan (%)	B – IPA:MeOH:AA:TEA (%)
0	0.80	100	0
3.00	0.80	100	0
5.00	0.80	90.0	10.0
17.00	0.80	60.0	40.0
18.00	0.80	0	100
23.00	0.80	0	100
26.00	0.80	90.0	10.0
28.00	0.80	100	0

DBA/J2, C57BL/6J, BFMI ve BMMI inbred farelerinin LD ve Q kas dokularından elde edilen lipitlerin nitel ve nicel karakterizasyonu için, çeşitli standartlar, kloroform ve metanol (2:1, v/v) çözücülerinde hazırlandı, ve HPLC-ELSD enstrümanında yukarıda belirtilen gradyan akış hızı ve sıcaklık şartlarında, 30 µl ve 50 µl alınarak yürütüldü. Bu standartlar, kolesterol (C), gliseril trioleat (TG), 1-oleoil-rak-gliserol (MG), kolesteril oleat (CO), fosfatidilkolin (PC) ve kardiyolipin (CLPN) idi.

Yürütülmüş olan örneklerin lipitlerinin miktarını kesin olarak tayin edebilmek için, standartlar farklı molaritelerde yürütüldü. Bunun sebebiyse, bu farklı konsantrasyonlar arasında kalan örnek lipitlerinin miktarını belirleyebilmektir. Bundan dolayı, her bir standart için ayrı bir kalibrasyon eğrisi Waters Empower Pro adlı bilgisayar programı kullanılarak çizildi.

DBA/J2, C57BL/6J, BFMI ve BMMI inbred farelerinin LD ve Q kas dokularından klasik Folch metoduyla elde edilen lipitler, -20°C' de muhafaza edildikleri yerden çıkartılıp, kloroform ve metanol (2:1, v/v) solüsyonlarında çözünerek HPLC-ELSD cihazına yukarıda bahsedilen geliştirdiğimiz metoda uygun yüklendi. DBA/J2, C57BL/6J ve BFMI inbred farelerinin örneklerinden 30 µl alınırken, BMMI inbred fare örneklerinden daha iyi ölçüm elde edebilmek için 50 µl alınıp cihazda yürütüldü.

3.7. İstatistiksel Analiz

Kontrol, BMMI ve BFMI grupları arasındaki değişimler ve bu değişimlerin istatistiksel anlamlılığın hesaplanması için Oneway ANOVA yöntemi ve art analiz olarak Dunnett's testi kullanılarak tüm gruplar kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Bu karşılaştırılma sırasında istatistiksel anlamlılık C57BL/6J ırkına göre tespit edilmişse # işareti ile, DBA/2J ırkına göre tespit edilmişse * işareti ile gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 şeklinde belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu proje kapsamında yapılan çalışmalar dört ana alt başlık altında rapor edilmiştir:

- I. Fare ırklarının karakterizasyonu
 - a) Fare ırklarının vücut ağırlıklarında görülen değişimler
 - b) Fare ırkları serum parametreleri ve ipITT sonuçları
- II. ATR-FTIR spektroskopisi çalışmaları
- III. Görüntüleme teknikleri ile yapılan çalışmalar
 - a) FTIR mikrospektroskopisi çalışmaları
 - b) Konfokal mikroskopisi çalışmaları
- IV. HPLC çalışmaları

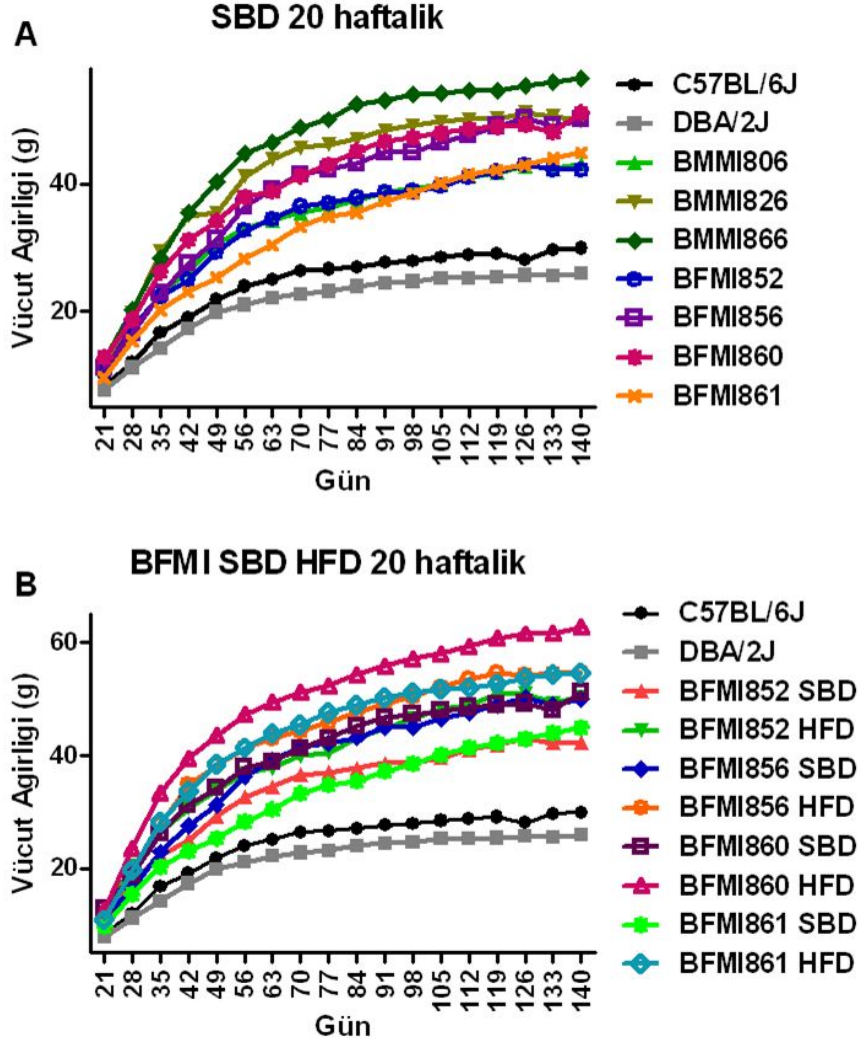
4.1. Fare ırklarının karakterizasyonu

Yetiştirilen farelerin fenotipik karakterizasyonu için hayvanların vücut ağırlıkları düzenli aralıklarla izlenmiş, bazı kan serumu parametreleri (serum kan şekeri, insülin, leptin, adiponektin, kolesterol, esterifiye olmamış yağ asidi, trigliserit seviyeleri) ölçümleri ve ipITT testi uygulanmıştır.

4.1.1. Vücut ağırlıkları

Projede kullanılan farelerin vücut ağırlıkları değişimi Şekil 6'de görülmektedir. Şekil 6A'da 20 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI farelerin vücut ağırlığı

değişimleri, Şekil 6B’de ise kontrol fareleri ile SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI farelerinin vücut ağırlığı değişimleri görülmektedir. Şekil 6A’dan görüldüğü üzere, kas kütlesi fazla olarak seçilmiş olan BMMI fareleri, özellikle BMMI866 ve BMMI826 farelerinin vücut ağırlıkları diğer tüm farelere göre yüksektir. BFMI fareleri içerisinde de yüksek yağ içerikli diyetle en fazla cevabı BFMI860 fareleri göstermiştir (Şekil 6B).

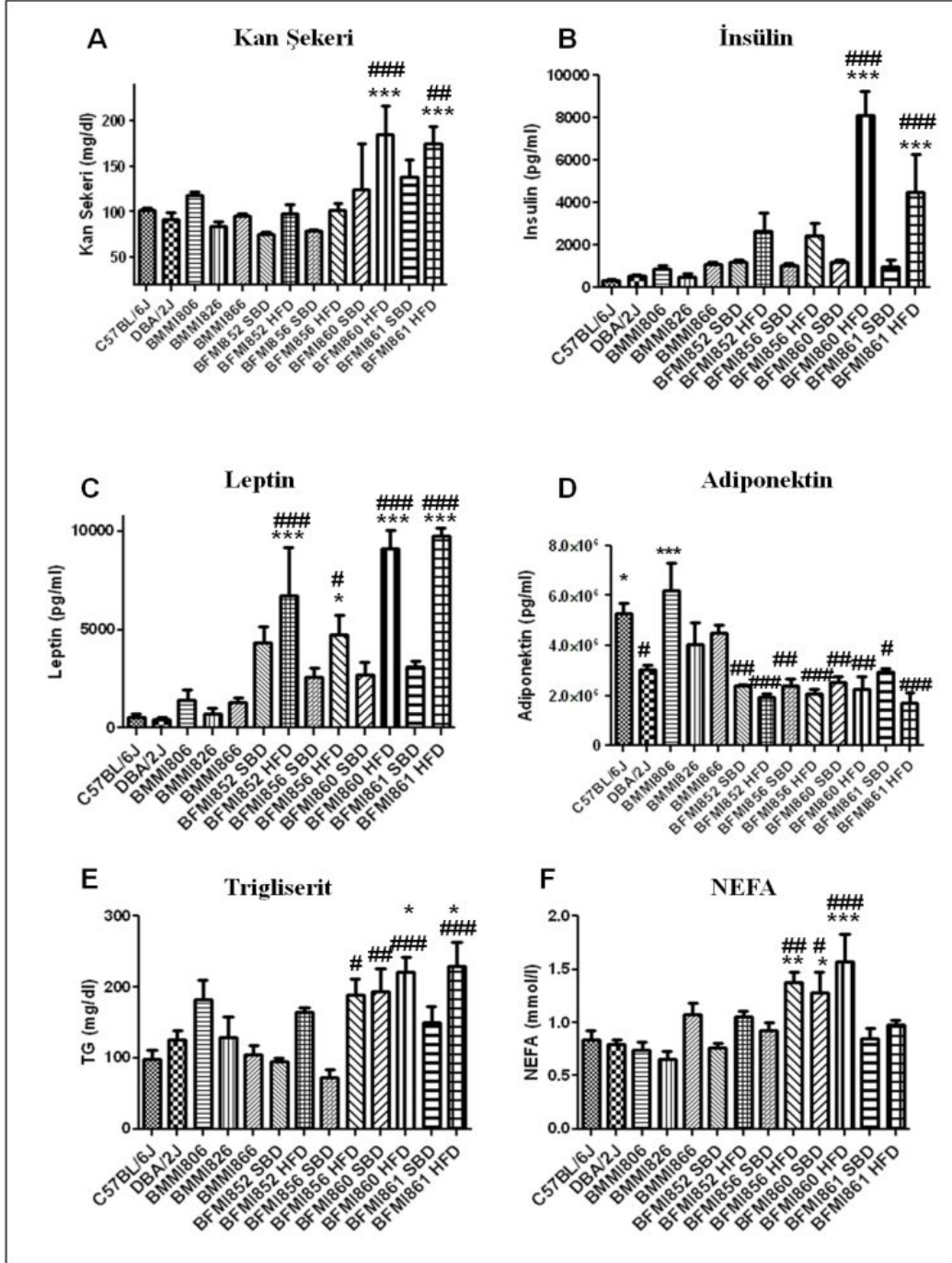


Şekil 6. 20 haftalık A) SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI farelerinin, B) SBD verilmiş kontrol, SBD verilmiş BFMI ve HFD verilmiş BFMI farelerinin değişik günlerde ölçülmüş vücut ağırlığı değişimleri.

4.1.2. Serum parametreleri ve ipITT sonuçları

Fareler 20 haftalık olduğunda dekapitasyon öncesi 2 saat aç bırakıldıktan sonra serumları toplanarak bu serumlardan bazı serum parametreleri ölçülmüş, buna ek olarak

intraperitoneal insülin tolerans testi ölçümleri gerçekleştirilmiştir. İncelenen tüm fare ırklarının serum kan şekeri, insülin, leptin, adiponektin, kolesterol, esterifiye olmamış yağ asidi, trigliserit seviyeleri ölçüm sonuçları Şekil 7’de gösterilmektedir.



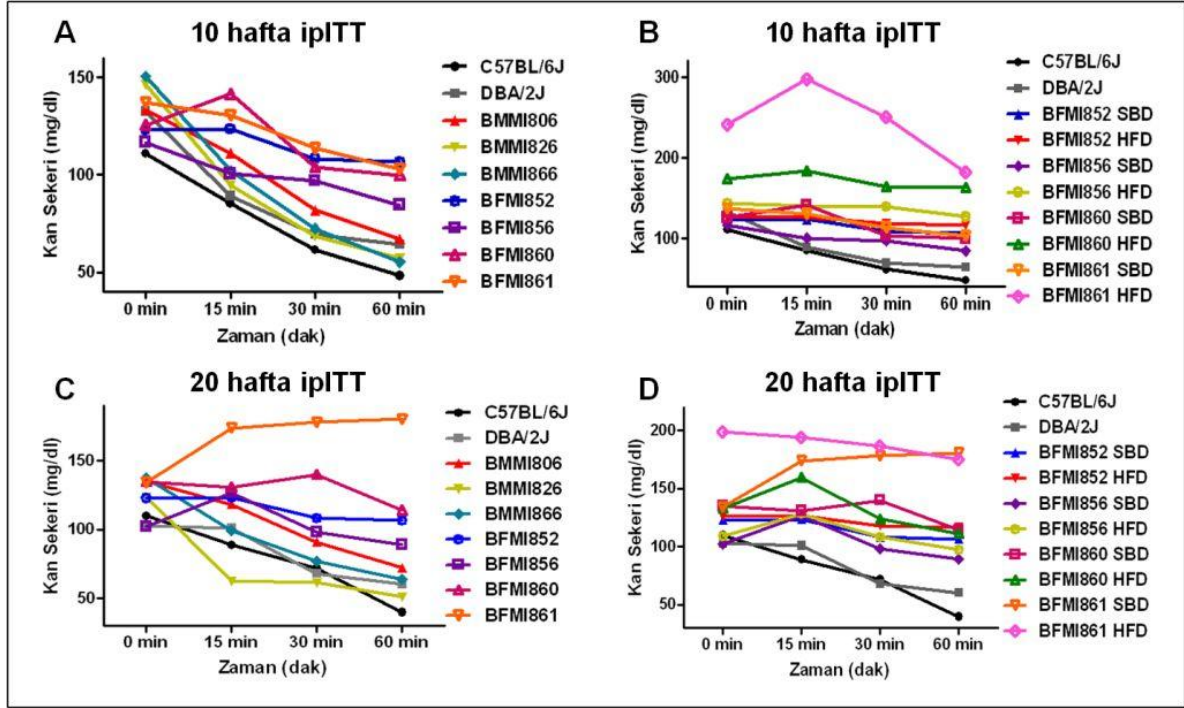
Şekil 7. 20 haftalık fareler 2 saat aç bırakıldıktan sonra toplanan kan örneklerinden elde edilen serum içeriğindeki A) kan şekeri (mg/dl), B) insülin (pg/dl), C) leptin (pg/dl), D) adiponektin (pg/dl), E) trigliserit (TG, mg/dl) ve F) esterifiye olmamış yağ asidi (NEFA, mmol/l) miktarlarındaki değişimler. Kontrol ve BMM ırkları sadece SBD ile beslenmiş, BFMI ırkları ise hem SBD hem HFD ile beslenmiştir.

Şekil 7A'dan görülebileceği üzere incelenen SBD verilmiş BFMI gruplarından en yüksek kan şekeri seviyesine sahip olan grup BFMI861 ırkıdır. BFMI ırklarına HFD verildiğinde kan şekeri en yüksek olarak kaydedilen ırklar ise BFM860 ve BFMI861'dir ve bu değerler kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermektedir. BMMI gruplarından BMMI806 en yüksek kan şekeri değerine sahiptir, fakat bu değer kontrol gruplarına göre anlamlı bir farklılık göstermemektedir. Gözlenen bu kan şekeri seviyelerine ek olarak BFMI860 ve BFMI861 gruplarında da en yüksek insülin değeri tespit edilmiştir (Şekil 7B). Hem kan şekeri hem de insülin seviyelerinin bu gruplarda yüksek olması, bu ırkların insülin direnci geliştirmiş olabileceklerini göstermektedir. Genel olarak HFD ile beslenmiş BFMI gruplarının daha yüksek kan şekeri ve insülin seviyelerine sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 7A-B).

Obezitede artan yağ dokusu, bir salgı bezi gibi görev yaparak kan dolaşımına bazı adipokinleri salgılar. Adipoz dokudan salgılanan adipokinler arasında leptin ve adiponektin de yer alır. Obezitede kan dolaşımındaki leptin miktarının arttığı ve adiponektin miktarının azaldığı daha önce pek çok çalışmada gösterilmiştir (LAGO v.d., 2009; FAIN, 2010; BALISTRERI v.d., 2010). Çalışmamızda kullanılan fare ırkları serum leptin seviyesinin BFMI ırklarında daha yüksek olduğu ve bu gruplar içerisinde de HFD ile beslenmiş BFMI860 ve BFMI861 ırklarında en üst seviyede olduğu tespit edilmiştir. Tüm HFD ile beslenmiş BFMI ırklarında leptin seviyesinin kontrollerden istatistiksel olarak anlamlı bir seviyede yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 7C). Kullanılan fare ırklarında adiponektin seviyesine de bakılmış ve kontrollerin, özellikle C57BL/6J'nin adiponektin seviyesinin BFMI ırklarından daha yüksek olduğu, buna ilaveten BMMI ırklarının adiponektin seviyelerinin BFMI ırklarından daha yüksek olduğu ve en yüksek adiponektin seviyesine sahip olan ırkın BMMI806 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7D). Serum trigliserit miktarının BFMI860 ve BFMI861 ırklarında, özellikle HFD ile beslenmiş gruplarda, daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 7E). Serum NEFA miktarı ise BFMI860 ırklarında en yüksek olarak kaydedilirken, BFMI861 ırkının BFMI860 ırkından daha düşük NEFA seviyesine sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 7F).

İncelenen fare ırklarındaki insülin duyarlılığı miktarını ölçmek için ipITT testi yapılmıştır, bu testin sonuçları Şekil 8'de gösterilmektedir. Şekil 8A'da 10 haftalık tüm SBD verilmiş grupların ipITT sonuçları, Şekil 8B'de 10 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol grupları ile SBD ve HFD verilmiş BFMI farelerinin ipITT sonuçları, Şekil 8C'de 20 haftalık tüm SBD verilmiş grupların ipITT sonuçları, Şekil 8D'de ise 20 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol grupları ile SBD ve HFD verilmiş BFMI farelerinin ipITT sonuçları

verilmiştir. Grafiklerde x ekseninde gösterilen zaman insülin enjeksiyonundan sonra ölçüm alınan zamanı göstermektedir.



Şekil 8. A) 10 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI farelerinin, B) 10 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol, SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI farelerinin, C) 20 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI farelerinin, D) 20 haftalık SBD ile beslenmiş kontrol, SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI farelerinin ipITT testi sonuçları.

Elde edilen 10 haftalık SBD ile beslenmiş farelerin ipITT test sonuçlarına göre, insülin enjeksiyonundan sonra kan şekeri değerinde BMMI ve kontrol farelerinin BFMI fareleri ile karşılaştırıldığında daha hızlı bir düşüş gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 8A). BFMI fareleri ise kan şekeri seviyelerinde daha yavaş bir düşüş göstermektedir. Bu durum 20 haftalık farelerde de gözlenmiştir, sadece BFMI861 ırkı kan şekeri seviyesi insülin enjeksiyonundan hiç etkilenmemiş ve artmaya devam etmiştir (Şekil 8C). 10 haftalık HFD ile beslenmiş 10 haftalık BFMI farelerinde SBD ile beslenmiş farelere göre daha yüksek kan şekeri değerleri elde edilmiştir. Ayrıca, HFD verilmiş gruplar daha sabit kan şekeri değerleri ortaya koymuşlardır (Şekil 8B). HFD verilmiş 20 haftalık farelerin ipITT grafikleri de en yüksek kan şekeri değerlerinin BFMI860 ve BFMI861 ırklarında gözlendiğini ortaya koymuştur (Şekil 8D).

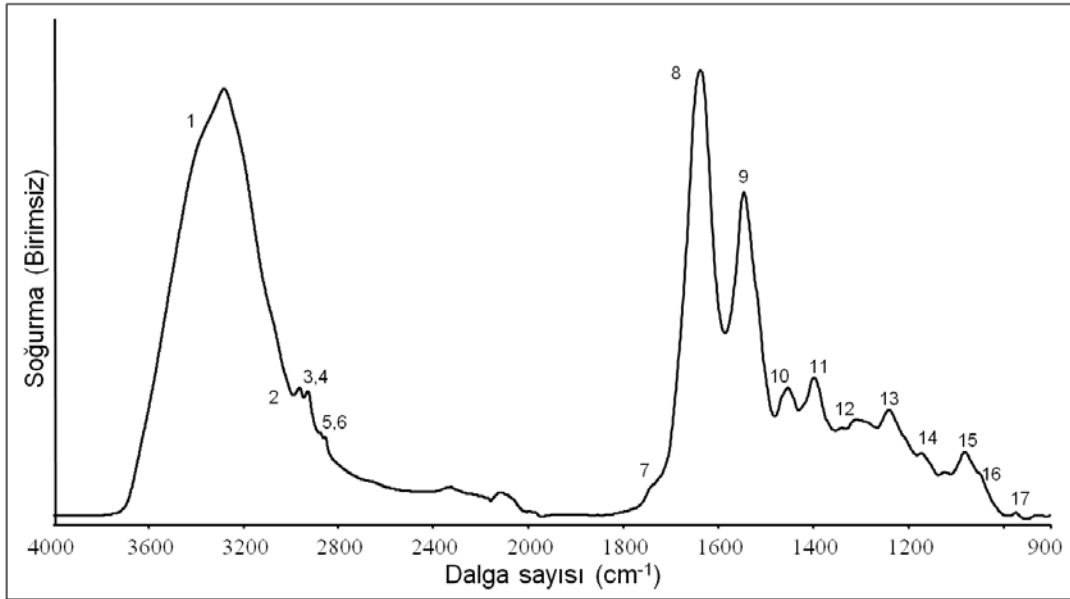
Tüm bu grafiklerden, BFMI ırklarında insülin enjeksiyonuna verilen cevabın kan şekeri seviyelerinin daha yavaş düşüşü şeklinde olduğu görülmüştür. Bu da insülin duyarlılığında bir azalma gösterdiklerine işaret etmektedir. Bu ırklar içerisinde insülin

direnci geliştirmeye en yakın ırklar ise BFMI860 ve BFMI861 ırklarındır. ipITT değerlerinde gözlenen bu sonuçlar, ölçülen serum parametreleri ile birlikte göz önüne alındığında da BFMI860 ve BFMI861 ırklarının, özellikle de HFD ile beslendiğinde insülin direnci gelişimi göstermiş olabilecekleri sonucuna varılmaktadır.

4.2. ATR-FTIR Spektroskopisi Çalışmaları

Moleküllerin değişik dalga boylarındaki titreşim gruplarını görüntüleyerek bu moleküllerin yapısal, fonksiyonel ve dinamik özelliklerinin karakterize edilmesini sağlayan bir teknik olan ATR-FTIR spektroskopik tekniği, projemizde kontrol, BMMI ve BFMI fare ırkları LD ve Q iskelet kaslarındaki makromoleküllerin, özellikle lipidlerin, relatif miktarlarının ve dinamiğinin tespiti ve yapısal özelliklerinin araştırması amacıyla kullanılmıştır.

Şekil 9’da bir iskelet kasının ham spektrumunun 4000-900 cm^{-1} frekans aralığındaki soğurma bantları gösterilmiştir. Moleküllerdeki değişik fonksiyonel gruplar FTIR spektrumunda karakteristik soğurma bantları oluşturmaktadır (MANTSCH, 1984; DIEM, 1999; CAKMAK v.d., 2006; OZEK v.d., 2009; BOZKURT v.d., 2010; OZEK v.d., 2010). Şekil 9’da numaralandırılmış bantların tanımları literatüre göre Tablo 4’de belirtilmiştir.



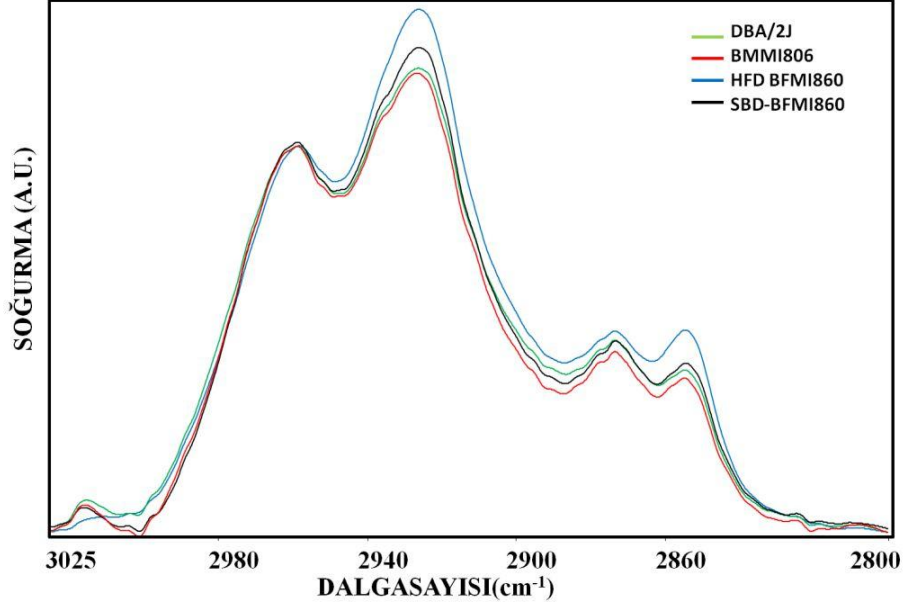
Şekil 9. 4000-900 cm^{-1} aralığında kayıt edilen örnek iskelet kas dokusu spektrumu.

Tablo 4. İskelet kas dokusunun IR spektrumundaki başlıca soğurmalar (RIGAS v.d., 1990; WONG v.d., 1991; TAKAHASHI v.d., 1991; JACKSON v.d., 1998; LYMAN v.d., 1999; MELIN v.d., 2000; CAKMAK v.d., 2006; TOYRAN v.d., 2006; OZEK v.d., 2009; OZEK v.d., 2010; BOZKURT v.d. 2010).

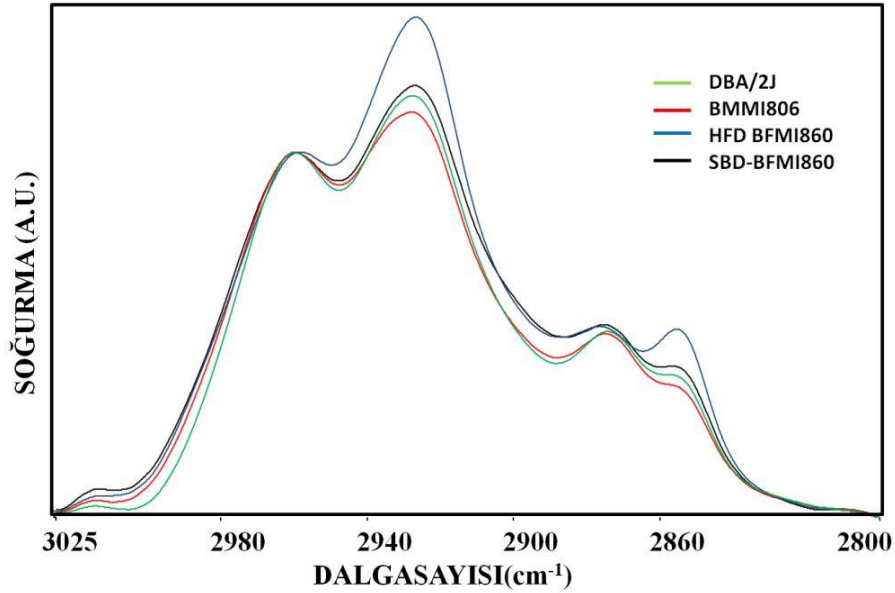
Band No	Frekans (cm ⁻¹)	Tanım
1	3280	Amid A: N-H gerilme, protein
2	3010	Olefinik HC=CH gerilme: doymamış lipit
3	2960	CH ₃ antisimetrik gerilme: çoğunlukla lipit
4	2927	CH ₂ antisimetrik gerilme: çoğunlukla lipit
5	2874	CH ₃ simetrik gerilme: çoğunlukla protein
6	2855	CH ₂ simetrik gerilme: çoğunlukla lipit
7	1740	Ester C=O gerilme: lipit
8	1638	Amid I: protein (80% C=O gerilme, 10% N-H bükülme, 10% C-N gerilme)
9	1545	Amid II: protein (60% N-H bükülme, 40% C-N gerilme)
10	1452	CH ₂ bükülme: lipit
11	1394	COO ⁻ simetrik gerilme: yağ asitleri
12	1343	CH ₂ kolajen yan zincir titreşimleri
13	1240	Proteoglikanların sülfat gerilim, kolajenin Amid III titreşimleri ve glisin ve prolin kaynaklı CH ₂ sallanma titreşimleri
14	1171	CO-O-C antisimetrik gerilme: fosfolipitler, trigliseritler ve kolesterol esterleri
15	1080	PO ₂ ⁻ simetrik gerilme: çoğunlukla nükleik asitlerden az kısmı fosfolipitlerden
16	1045	C-O gerilme: glikojen, polisakkaritler, karbonhidratlar
17	976	C-N+-C gerilme: nükleik asitler, RNA riboz-fosfat ana zincir titreşimleri

IR bandlarının sinyal şiddetleri ve bu bandların altında kalan alanlar, adı geçen fonksiyonel grubun konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir (FREIFELDER v.d., 1982; TAKAHASHI v.d., 1991; LIU v.d., 2002; SEVERCAN v.d.; 2005; CAKMAK v.d., 2006). Yapılan analizler sonucu elde edilen başlıca fonksiyonel grupların frekans ve bant alanı değerlerindeki değişimler Tablo 5-12'de gösterilmiştir.

Şekil 10 ve 11, SBD ile beslenmiş kontrol DBA/2J, BMMI806, BFMI860 ve HFD ile beslenmiş BFMI860 fare modellerinin, sırasıyla LD ve Q iskelet kas dokularının 3050 – 2800 cm⁻¹ bölgesindeki ortalama FTIR spektrumlarını göstermektedir. Gruplar arasında görsel karşılaştırma yapabilmek için spektrumlar CH₃ antisimetrik gerilme bandına göre normalize edilmiştir.



Şekil 10. SBD ile beslenmiş kontrol DBA/2J, BMMI806, BFM1860 ve HFD ile beslenmiş BFM1860 fare ırkları LD kas dokularına ait 3025-2800 cm^{-1} frekans aralığında CH_3 antisimetrik gerilim bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.



Şekil 11. SBD ile beslenmiş kontrol DBA/2J, BMMI806, BFM1860 ve HFD ile beslenmiş BFM1860 fare ırkları Q kas dokularına ait 3025-2800 cm^{-1} frekans aralığında CH_3 antisimetrik gerilim bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.

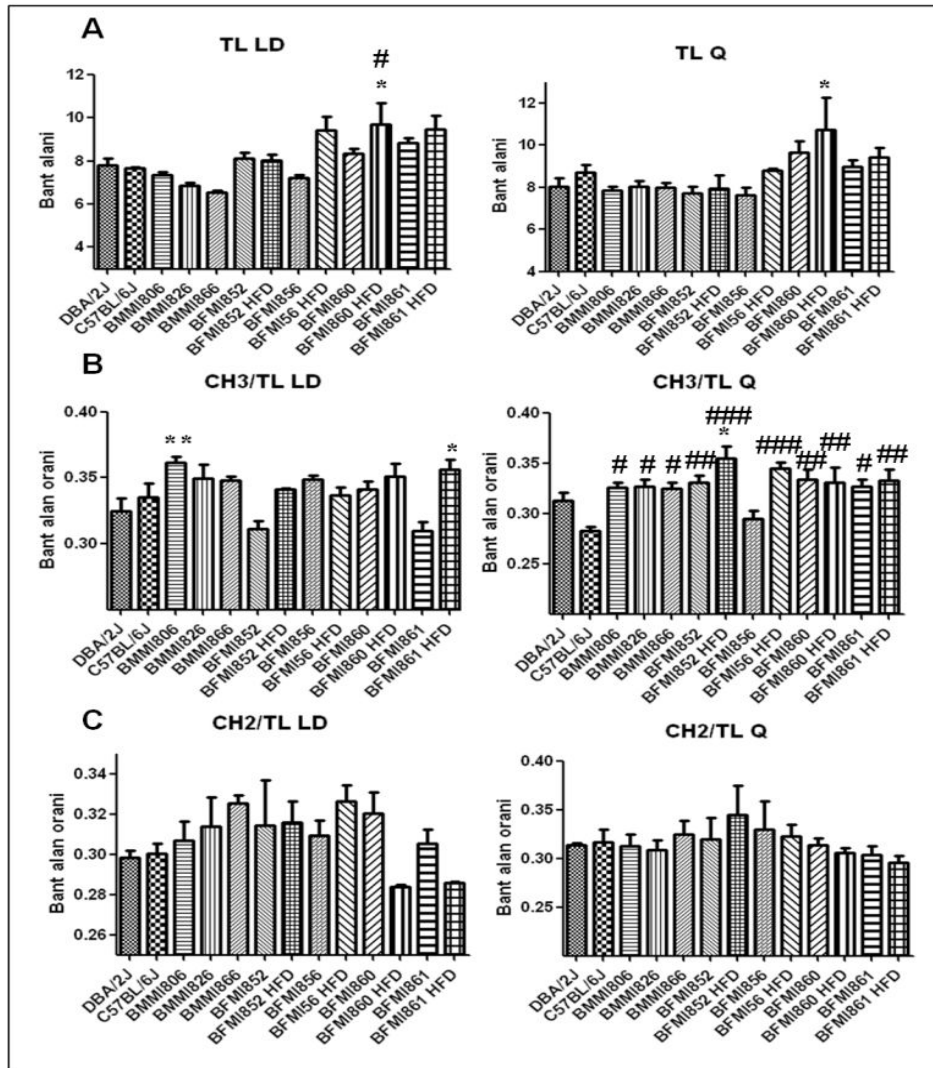
Bu bölgedeki bantlar sırası ile olefinik $\text{HC}=\text{CH}$ gruplarındaki CH gerilmelerinin titreşimlerinden, CH_3 antisimetrik gerilme titreşimlerinden, CH_2 antisimetrik gerilme titreşimlerinden, CH_3 simetrik gerilme titreşimlerinden ve CH_2 simetrik gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (WATTS ve DE PONT, 1986; SEVERCAN v.d., 2000; SEVERCAN v.d., 2005; CAKMAK v.d., 2006). Bu bölgede bulunan CH_2

antisimetrik, CH₂ simetrik ve CH₃ antisimetrik gerilme titreşimlerinin bant şiddetleri veya band alanları ağırlıklı olarak sistemdeki lipit miktarı ve CH₃ simetrik gerilme titreşimlerinin bant şiddeti/alanı ise sistemdeki protein miktarları hakkında bilgi vermektedir (MANTSCH, 1984; SEVERCAN v.d., 2000, SEVERCAN v.d., 2010, CAKMAK v.d. 2011).

Projede kullanılan BMMI modellerinden BMMI826 ve BMMI866 fare ırklarının homozigot myostatin mutasyonuna sahip olduğu, BMMI806 ırkında ise myostatin büyüme faktörünü kodlayan genin (wild type) bulunduğu Prof. Dr. Gudrun Brockmann'ın grubu tarafından tespit edilmiştir. Myostatin, bir gelişim faktörü (growth factor) olup kas gelişimi üzerine olumsuz etkiye sahiptir. Myostatin konsantrasyonu ne kadar artarsa bireyde kas gelişimi o kadar azalmaktadır. Myostatin yokluğunda ise kas gelişimi artmakta ve kas içerisindeki yağ oranı azalmaktadır (GUO v.d., 2009). Yapılan çalışmalarda myostatin yıkımının yani myostatin yokluğunun obezite gelişimini azalttığı gösterilmiştir (ZHAO v.d., 2005). Projemizde de, BMMI826 fare modelinin, mutasyon dolayısıyla daha fazla kas gelişimi gösterdiği ve daha az yağ içeriğine sahip olduğu projemizin Alman grubunun yapması planlanan çalışmalar dahilinde nükleer manyetik rezonans (NMR) tekniğini kullanan bir cihaz olan SMART Trac sistemi ile Prof. Dr. Gudrun Brockmann'ın grubu tarafından tespit edilmiştir (KARST v.d., 2010). Bu sonuç, ATR-FTIR çalışmamızın sonuçları ile de desteklenmektedir. Tablo 4'te görüldüğü gibi çalışmamız sonucunda LD kas dokusunda da BMMI826 ve BMMI866 fare modellerinde CH₂ antisimetrik, CH₂ simetrik ve CH₃ antisimetrik gerilme titreşimlerinin bant alanlarının, dolayısı ile lipit konsantrasyonlarının, BMMI806 grubuna göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Şekil 12A'da CH₂ antisimetrik, CH₂ simetrik, CH₃ antisimetrik gerilme titreşimlerinin ve CH₂ bükülme titreşiminin bant alanlarının toplanması ile elde edilen toplam lipit oranının LD ve Q kaslarında değişimleri gösterilmiştir. Şekil 12A'da görülebileceği üzere BMMI826 ve BMMI866 ırklarında toplam lipit miktarı LD kasında BMMI806 ırkına göre daha düşüktür. Bunun yanı sıra, LD kasında tüm ırklar içerisinde en düşük toplam lipit miktarına sahip olan ırklar da BMMI826 ve BMMI866'dır (Şekil 12A). Q kasında ise BMMI ırkları arasında lipit bant alanları birbirine yakın olarak hesaplanmış ve anlamlı değişiklikler görülememiştir.

Kullanılan BFMI ırkları birbirleriyle kıyaslandığında, BFMI860 fare ırkları, en yüksek vücut yağ yüzdesine sahip farelerdir. Kandaki şeker konsantrasyonunun en yüksek olduğu ırk BFMI861'dir ve en düşük kan şeker konsantrasyonuna sahip fare ırkı ise BFMI856'dır (MEYER v.d., 2009). Bu çalışma sonuçlarına göre, lipitlerden kaynaklı CH₂

antisimetrik, CH₂ simetrik, CH₃ antisimetrik gerilme titreşimlerinin ve CH₂ bükülme bant alanlarının toplamından elde edilen total lipit değerlerine bakıldığında, SBD ile beslenmiş BFMI852, BFMI860 ve BFMI861 ırklarının LD kaslarında en fazla lipit içeriğinin bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 12A). Bu ırklar HFD ile beslendiklerinde LD kaslarının lipit içeriği artarken BFMI852 ırkında HFD ile beslenmenin lipit içeriğinde pek bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir. HFD verilmiş gruplar arasında en fazla lipit içeriği her iki kasta da BFMI860 ırkında görülmüştür.



Şekil 12. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında A) total lipit miktarında, B) lipit içeriğindeki metil grubu dağılımında (CH₃ antisimetrik gerilme bant alanı/total lipit), C) lipit içeriğindeki metilen grubu dağılımında (CH₂ antisimetrik gerilme bant alanı/total lipit) olan farklılıkları gösteren bar diagramları (Verilen değer DBA/2J ırkına göre anlamlı ise *, C57BL/6J ırkına göre anlamlı ise # işareti ile gösterilmiştir).

Tablo 5. SBD ile beslenmiş kontrol ve BMMI fare hatları **LD** iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların **alan** değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak ifade edilmiştir.

Bant No		C57BL/6J (n=6)	DBA/2J (n=6)	BMMI NN806 (n=6)	BMMI CC826 (n=6)	BMMI CC866 (n=6)
		Alan				
2	3010	2.39 \pm 0.05^{***}	1.89 \pm 0.07^{###}	1.63 \pm 0.00^{***, ###}	2.10 \pm 0.01^{** , ###}	2.54 \pm 0.01^{***}
3	2960	2.56 \pm 0.06	2.52 \pm 0.08	2.66 \pm 0.04	2.39 \pm 0.06	2.27 \pm 0.03
4	2927	2.30 \pm 0.04	2.32 \pm 0.07	2.26 \pm 0.08	2.15 \pm 0.09	2.13 \pm 0.04
5	2874	0.64 \pm 0.01	0.68 \pm 0.03	0.57 \pm 0.02	0.54 \pm 0.02	0.66 \pm 0.01
6	2855	0.59 \pm 0.01	0.52 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02	0.46 \pm 0.02	0.44 \pm 0.01
7	1740	0.27 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02	0.24 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01[#]	0.18 \pm 0.01
8	1656	16.89 \pm 0.34	16.71 \pm 0.66	16.36 \pm 0.30	15.97 \pm 0.70	16.21 \pm 0.28
9	1540	8.80 \pm 0.29	9.71 \pm 0.76	8.36 \pm 0.34	8.40 \pm 0.77	7.90 \pm 0.28
10	1452	2.20 \pm 0.05	2.42 \pm 0.15	1.91 \pm 0.06	1.85 \pm 0.13	1.70 \pm 0.05
11	1394	2.14 \pm 0.07	2.20 \pm 0.16	1.78 \pm 0.05	1.72 \pm 0.11	1.74 \pm 0.05
12	1343	0.79 \pm 0.02	0.99 \pm 0.06	0.74 \pm 0.01	0.63 \pm 0.03^{**}	0.72 \pm 0.02[*]
13	1240	1.78 \pm 0.04	2.07 \pm 0.16	1.46 \pm 0.13	1.38 \pm 0.11	1.32 \pm 0.05
14	1170	0.80 \pm 0.02	0.81 \pm 0.04	0.98 \pm 0.03	0.79 \pm 0.03	0.78 \pm 0.02
15	1080	1.05 \pm 0.02	1.06 \pm 0.05	0.85 \pm 0.02	0.72 \pm 0.04	0.75 \pm 0.02
16	1046	0.25 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01
17	976	0.03 \pm 0.002	0.03 \pm 0.002	0.03 \pm 0.001	0.03 \pm 0.002	0.03 \pm 0.001

Tablo 6. SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI fare hatları **LD** iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların **alan** değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak ifade edilmiştir.

Bant No		BFMI852 SBD (n=6)	BFMI852 HFD (n=6)	BFMI856 SBD (n=6)	BFMI856 HFD (n=6)	BFMI860 SBD (n=6)	BFMI860 HFD (n=6)	BFMI861 SBD (n=6)	BFMI861 HFD (n=6)
		Alan							
2	3010	1.85 \pm 0.04^{###}	1.92 \pm 0.01 ^{###}	2.08 \pm 0.01^{*,###}	1.99 \pm 0.05^{###}	1.90 \pm 0.03^{###}	2.00 \pm 0.00^{###}	1.77 \pm 0.07^{###}	2.08 \pm 0.02^{*,###}
3	2960	2.53 \pm 0.08	2.74 \pm 0.09	2.52 \pm 0.03	3.16 \pm 0.15^{*,##}	2.86 \pm 0.10	3.34 \pm 0.24^{***,###}	2.47 \pm 0.07	3.35 \pm 0.15^{***,###}
4	2927	2.54 \pm 0.15	2.55 \pm 0.17	2.23 \pm 0.06	3.05 \pm 0.12^{*,##}	2.68 \pm 0.12	2.74 \pm 0.28	2.70 \pm 0.08	2.71 \pm 0.18
5	2874	0.56 \pm 0.03	0.74 \pm 0.04	0.55 \pm 0.01	0.89 \pm 0.05^{*,##}	0.67 \pm 0.03	0.94 \pm 0.11^{***,###}	0.73 \pm 0.02	0.96 \pm 0.07^{***,###}
6	2855	0.67 \pm 0.05	0.64 \pm 0.04	0.46 \pm 0.02	0.65 \pm 0.02	0.60 \pm 0.03	0.59 \pm 0.07	0.69 \pm 0.03[*]	0.56 \pm 0.05
7	1740	0.34 \pm 0.02	0.35 \pm 0.04[*]	0.29 \pm 0.01	0.35 \pm 0.04[*]	0.30 \pm 0.01	0.37 \pm 0.05^{**}	0.30 \pm 0.02	0.35 \pm 0.05[*]
8	1656	16.77 \pm 0.91	16.15 \pm 0.22	16.44 \pm 0.28	17.64 \pm 1.54	17.18 \pm 0.45	19.98 \pm 1.58	17.77 \pm 0.56	19.74 \pm 0.97
9	1540	8.89 \pm 0.94	7.96 \pm 0.16	7.98 \pm 0.28	10.03 \pm 1.69	9.21 \pm 0.47	13.16 \pm 1.99[#]	11.34 \pm 0.31	12.38 \pm 1.16
10	1452	2.39 \pm 0.21	2.10 \pm 0.04	2.01 \pm 0.06	2.56 \pm 0.33	2.22 \pm 0.11	2.99 \pm 0.41	2.73 \pm 0.11	2.85 \pm 0.24
11	1394	2.03 \pm 0.19	1.99 \pm 0.03	1.98 \pm 0.06	2.38 \pm 0.36	2.11 \pm 0.12	3.02 \pm 0.46	2.62 \pm 0.06	2.85 \pm 0.24
12	1343	1.01 \pm 0.08	0.61 \pm 0.02^{**}	0.82 \pm 0.02	0.96 \pm 0.12	0.84 \pm 0.06	0.92 \pm 0.10	1.10 \pm 0.04[#]	0.85 \pm 0.06
13	1240	2.06 \pm 0.20	1.76 \pm 0.02	1.48 \pm 0.05	2.28 \pm 0.27	1.63 \pm 0.12	2.53 \pm 0.36	2.32 \pm 0.10	2.43 \pm 0.22
14	1170	1.09 \pm 0.06[#]	1.05 \pm 0.02	0.84 \pm 0.02	1.11 \pm 0.06^{*,#}	0.86 \pm 0.07	1.11 \pm 0.15^{*,#}	0.94 \pm 0.03	1.12 \pm 0.10^{*,#}
15	1080	1.10 \pm 0.08	1.13 \pm 0.08	0.85 \pm 0.03	1.54 \pm 0.13	1.07 \pm 0.08	1.65 \pm 0.34^{*,#}	1.22 \pm 0.02	1.62 \pm 0.17[#]
16	1046	0.25 \pm 0.02	0.34 \pm 0.04	0.20 \pm 0.01	0.45 \pm 0.03^{*,#}	0.29 \pm 0.02	0.46 \pm 0.11^{*,#}	0.26 \pm 0.01	0.43 \pm 0.05[#]
17	976	0.04 \pm 0.003	0.02 \pm 0.003	0.03 \pm 0.002	0.03 \pm 0.003	0.03 \pm 0.006	0.05 \pm 0.002	0.04 \pm 0.004	0.03 \pm 0.004

Tablo 7. SBD ile beslenmiş kontrol ve BMMI fare hatları Q iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların **alan** değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak ifade edilmiştir.

Bant No		C57BL/6J (n=6)	DBA/2J (n=6)	BMMI NN806 (n=6)	BMMI CC826 (n=6)	BMMI CC866 (n=6)
		Alan				
2	3010	2.59 \pm 0.05^{***}	2.00 \pm 0.01^{###}	1.99 \pm 0.03^{###}	2.03 \pm 0.04^{###}	2.73 \pm 0.05^{***}
3	2960	2.46 \pm 0.06	2.51 \pm 0.04	2.56 \pm 0.06	2.62 \pm 0.08	2.59 \pm 0.08
4	2927	2.75 \pm 0.12	2.52 \pm 0.08	2.45 \pm 0.08	2.49 \pm 0.11	2.59 \pm 0.11
5	2874	0.70 \pm 0.03	0.62 \pm 0.02	0.68 \pm 0.02	0.67 \pm 0.03	0.67 \pm 0.03
6	2855	0.67 \pm 0.04	0.53 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02	0.51 \pm 0.03	0.54 \pm 0.03
7	1740	0.27 \pm 0.02	0.20 \pm 0.00	0.26 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01
8	1656	18.52 \pm 0.59	17.83 \pm 0.62	17.09 \pm 0.59	17.68 \pm 0.65	17.85 \pm 0.75
9	1540	11.60 \pm 0.76	9.85 \pm 0.50	9.90 \pm 0.64	10.81 \pm 0.77	10.83 \pm 0.69
10	1452	2.81 \pm 0.15	2.49 \pm 0.16	2.34 \pm 0.12	2.43 \pm 0.15	2.27 \pm 0.13
11	1394	2.64 \pm 0.17	2.20 \pm 0.11	2.00 \pm 0.13	2.17 \pm 0.16	2.19 \pm 0.11
12	1343	1.05 \pm 0.05	1.05 \pm 0.07	0.85 \pm 0.05	0.89 \pm 0.05	0.83 \pm 0.03
13	1240	2.35 \pm 0.12	2.06 \pm 0.18	1.61 \pm 0.10	1.78 \pm 0.11	1.77 \pm 0.10
14	1170	0.99 \pm 0.05	0.85 \pm 0.00	0.61 \pm 0.06#	0.65 \pm 0.04	0.63 \pm 0.02
15	1080	1.27 \pm 0.07	1.14 \pm 0.06	0.92 \pm 0.05	0.93 \pm 0.05	0.90 \pm 0.03
16	1046	0.32 \pm 0.02	0.25 \pm 0.02	0.20 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01	0.27 \pm 0.01
17	976	0.04 \pm 0.003	0.04 \pm 0.001	0.02 \pm 0.004	0.03 \pm 0.003	0.03 \pm 0.004

Tablo 8. SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI fare hatları Q iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların **alan** değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak ifade edilmiştir.

Bant No		BFMI852 SBD (n=6)	BFMI852 HFD (n=6)	BFMI856 SBD (n=6)	BFMI856 HFD (n=6)	BFMI860 SBD (n=6)	BFMI860 HFD (n=6)	BFMI861 SBD (n=6)	BFMI861 HFD (n=6)
		Alan							
2	3010	2.02 \pm 0.04 ^{###}	1.92 \pm 0.01 ^{###}	2.27 \pm 0.02 ^{***,###}	1.44 \pm 0.01 ^{***,###}	1.84 \pm 0.07 ^{*,###}	1.88 \pm 0.00 ^{###}	1.99 \pm 0.02 ^{###}	2.02 \pm 0.01 ^{###}
3	2960	2.55 \pm 0.11	3.14 \pm 0.00 [#]	2.24 \pm 0.10	3.03 \pm 0.10	3.21 \pm 0.19 ^{*,##}	3.44 \pm 0.33 ^{***,###}	2.93 \pm 0.09	3.1 \pm 0.04 [#]
4	2927	2.45 \pm 0.14	2.65 \pm 0.06	2.50 \pm 0.22	2.84 \pm 0.14	3.03 \pm 0.19	3.26 \pm 0.45	2.73 \pm 0.12	2.77 \pm 0.07
5	2874	0.66 \pm 0.04	0.82 \pm 0.01	0.54 \pm 0.05	0.81 \pm 0.04	0.88 \pm 0.06 [*]	1.02 \pm 0.15 ^{***,##}	0.79 \pm 0.04	0.95 \pm 0.03
6	2855	0.56 \pm 0.03	0.61 \pm 0.02	0.68 \pm 0.07	0.68 \pm 0.02	0.73 \pm 0.04	0.80 \pm 0.13 ^{**}	0.64 \pm 0.03	0.61 \pm 0.02
7	1740	0.27 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02	0.31 \pm 0.03	0.34 \pm 0.05 [*]	0.32 \pm 0.04	0.35 \pm 0.05 [*]	0.27 \pm 0.02	0.29 \pm 0.04
8	1656	17.31 \pm 0.95	17.98 \pm 0.43	17.03 \pm 0.95	17.06 \pm 1.19	19.47 \pm 1.19	20.64 \pm 2.01	18.88 \pm 0.72	19.85 \pm 0.78
9	1540	10.23 \pm 1.12	10.21 \pm 0.45	9.77 \pm 1.13	9.64 \pm 1.14	13.12 \pm 1.37	14.97 \pm 2.63	12.31 \pm 0.97	12.96 \pm 0.78
10	1452	2.15 \pm 0.20	2.59 \pm 0.12	2.21 \pm 0.21	2.47 \pm 0.25	2.68 \pm 0.23	3.49 \pm 0.58	2.68 \pm 0.17	3.13 \pm 0.24
11	1394	2.07 \pm 0.24	2.45 \pm 0.10	2.06 \pm 0.21	2.26 \pm 0.25	2.59 \pm 0.27	3.46 \pm 0.63 [*]	2.54 \pm 0.20	2.88 \pm 0.17
12	1343	0.80 \pm 0.07	1.05 \pm 0.05	0.75 \pm 0.05	0.91 \pm 0.09	0.88 \pm 0.08	1.1 \pm 0.14	0.99 \pm 0.06	1.15 \pm 0.08
13	1240	1.60 \pm 0.16	2.29 \pm 0.11	1.74 \pm 0.16	2.24 \pm 0.23	2.06 \pm 0.17	2.91 \pm 0.45	2.24 \pm 0.15	2.77 \pm 0.26
14	1170	0.83 \pm 0.07	0.97 \pm 0.04	0.88 \pm 0.03	1.16 \pm 0.06	1.13 \pm 0.07	1.26 \pm 0.56 [*]	1.07 \pm 0.07	1.1 \pm 0.03
15	1080	0.90 \pm 0.09	1.48 \pm 0.02	0.93 \pm 0.10	1.43 \pm 0.08	1.23 \pm 0.08	1.90 \pm 0.42 [*]	1.18 \pm 0.10	1.51 \pm 0.09
16	1046	0.21 \pm 0.02	0.39 \pm 0.01	0.22 \pm 0.03	0.36 \pm 0.02	0.33 \pm 0.03	0.63 \pm 0.17 ^{***,##}	0.26 \pm 0.02	0.5 \pm 0.04 [*]
17	976	0.03 \pm 0.002	0.03 \pm 0.002	0.04 \pm 0.006	0.09 \pm 0.001	0.03 \pm 0.006	0.06 \pm 0.015	0.04 \pm 0.003	0.03 \pm 0.01

Tablo 9. SBD ile beslenmiş kontrol ve BMMI fare hatları **LD** iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların **frekans** değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak ifade edilmiştir.

Bant No	C57BL/6J (n=6)	DBA/2J (n=6)	BMMI NN806 (n=6)	BMMI CC826 (n=6)	BMMI CC866 (n=6)
Frekans					
2	3013.27 \pm 1.59	3016.11 \pm 0.16	3012.67 \pm 0.92	3015.92 \pm 1.42	3011.08 \pm 1.19^{**}
3	2961.43 \pm 0.94	2959.28 \pm 0.39	2959.27 \pm 0.37	2958.77 \pm 0.28[#]	2962.43 \pm 0.63^{**}
4	2923.71 \pm 0.62	2923.07 \pm 0.20^{###}	2922.39 \pm 0.56	2924.13 \pm 1.01	2923.08 \pm 0.31
5	2872.79 \pm 0.10	2873.28 \pm 0.11^{###}	2873.19 \pm 0.11	2873.27 \pm 0.15	2872.56 \pm 0.18^{**}
6	2852.66 \pm 0.04	2852.61 \pm 0.10	2852.34 \pm 0.17	2852.63 \pm 0.18	2852.50 \pm 0.09
7	1741.75 \pm 0.63	1741.61 \pm 0.89	1741.36 \pm 0.55	1740.15 \pm 0.33	1741.76 \pm 0.30
8	1638.09 \pm 0.06	1638.14 \pm 0.31	1638.61 \pm 0.05	1638.27 \pm 0.16	1638.43 \pm 0.13
9	1547.44 \pm 0.13	1547.08 \pm 0.99	1547.90 \pm 0.20	1548.40 \pm 0.28	1548.23 \pm 0.22
10	1452.56 \pm 0.50	1453.92 \pm 0.91	1452.39 \pm 0.39^{*,###}	1456.21 \pm 0.56^{*,###}	1455.92 \pm 0.26^{###}
11	1399.46 \pm 0.72^{***}	1398.03 \pm 0.18^{###}	1398.12 \pm 0.13^{###}	1397.75 \pm 0.11^{###}	1397.78 \pm 0.13^{###}
12	1345.11 \pm 0.13	1343.67 \pm 0.35	1343.65 \pm 0.65	1343.34 \pm 1.14	1343.90 \pm 0.90
13	1241.39 \pm 0.14	1240.55 \pm 0.24	1238.81 \pm 0.47	1238.65 \pm 0.60	1238.45 \pm 0.92[#]
14	1172.03 \pm 0.13	1171.37 \pm 0.40	1172.67 \pm 0.41[*]	1172.68 \pm 0.13[*]	1172.41 \pm 0.12
15	1080.46 \pm 0.45	1079.68 \pm 0.41	1078.96 \pm 0.12[#]	1078.50 \pm 0.25^{###}	1078.42 \pm 0.22^{*,###}
16	1046.15 \pm 0.07^{***}	1047.19 \pm 0.11^{###}	1045.88 \pm 0.13^{***}	1045.95 \pm 0.14^{***}	1045.89 \pm 0.03^{***}
17	976.11 \pm 0.21	975.37 \pm 0.69	976.47 \pm 0.34	976.59 \pm 0.49	976.92 \pm 0.25

Tablo 10. SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI fare hatları **LD** iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların **frekans** değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak ifade edilmiştir.

Bant No	BFMI852 SBD (n=6)	BFMI852 HFD (n=6)	BFMI856 SBD (n=6)	BFMI856 HFD (n=6)	BFMI860 SBD (n=6)	BFMI860 HFD (n=6)	BFMI861 SBD (n=6)	BFMI861 HFD (n=6)
Frekans								
2	3010.80 \pm 1.11^{**}	3003.09 \pm 0.65^{***,###}	3011.09 \pm 1.02^{**}	3002.31 \pm 0.17^{***,###}	3012.01 \pm 1.02[*]	3005.92 \pm 1.14^{***,###}	3012.95 \pm 0.71	3009.78 \pm 0.24^{***}
3	2958.91 \pm 0.77[#]	2957.85 \pm 0.04^{###}	2959.56 \pm 0.25	2957.54 \pm 0.21^{###}	2961.31 \pm 1.25	2958.28 \pm 0.13^{###}	2959.07 \pm 0.33	2957.86 \pm 0.06^{###}
4	2922.58 \pm 0.81	2923.67 \pm 0.08	2923.27 \pm 0.28	2924.09 \pm 0.09	2923.13 \pm 0.15	2923.57 \pm 0.03	2923.12 \pm 0.15	2923.45 \pm 0.09
5	2873.05 \pm 0.12	2873.11 \pm 0.04	2873.52 \pm 0.23[#]	2872.47 \pm 0.09^{**}	2872.91 \pm 0.17	2871.98 \pm 0.22^{*,#}	2873.26 \pm 0.09	2871.70 \pm 0.19^{***,###}
6	2852.29 \pm 0.15	2853.30 \pm 0.03^{***,###}	2852.46 \pm 0.06	2853.30 \pm 0.07^{***,###}	2852.50 \pm 0.12	2852.80 \pm 0.06	2852.68 \pm 0.05	2852.84 \pm 0.10
7	1743.73 \pm 0.77	1741.55 \pm 0.36	1742.24 \pm 0.68	1742.70 \pm 0.23	1741.97 \pm 0.57	1742.91 \pm 0.36	1742.52 \pm 0.78	1742.68 \pm 0.01
8	1638.98 \pm 0.30^{*,#}	1638.27 \pm 0.17	1638.76 \pm 0.09	1638.41 \pm 0.16	1638.55 \pm 0.13	1637.87 \pm 0.30	1638.49 \pm 0.08	1638.28 \pm 0.17
9	1549.05 \pm 0.80	1547.52 \pm 0.17	1547.83 \pm 0.17	1547.11 \pm 0.70	1547.12 \pm 0.24	1546.07 \pm 0.90	1546.90 \pm 0.70	1546.82 \pm 0.40
10	1456.48 \pm 0.87^{*,###}	1454.90 \pm 0.28	1455.74 \pm 0.35^{###}	1455.24 \pm 0.79[#]	1454.99 \pm 0.48	1454.17 \pm 0.67	1454.07 \pm 0.16	1454.43 \pm 0.20
11	1398.31 \pm 0.18[#]	1397.87 \pm 0.08^{###}	1397.74 \pm 0.16^{###}	1397.86 \pm 0.14^{###}	1398.05 \pm 0.12^{###}	1397.54 \pm 0.27^{###}	1397.94 \pm 0.08^{###}	1397.77 \pm 0.11^{###}
12	1340.58 \pm 0.94^{###}	1343.53 \pm 0.49	1343.71 \pm 0.74	1343.78 \pm 0.26	1343.16 \pm 1.03	1340.92 \pm 0.62^{###}	1341.50 \pm 0.94[#]	1343.94 \pm 0.23
13	1239.44 \pm 0.54	1239.81 \pm 0.28	1237.16 \pm 1.32^{***,###}	1239.08 \pm 0.68	1238.94 \pm 0.65	1238.90 \pm 0.52	1240.11 \pm 0.20	1238.92 \pm 0.25
14	1173.89 \pm 0.69^{***,###}	1172.46 \pm 0.01	1172.55 \pm 0.13[*]	1172.40 \pm 0.05	1172.78 \pm 0.23^{**}	1172.41 \pm 0.08	1172.35 \pm 0.26	1172.60 \pm 0.06[*]
15	1079.72 \pm 0.27	1077.54 \pm 0.23^{***,###}	1078.83 \pm 0.16^{###}	1075.93 \pm 0.16^{***,###}	1077.50 \pm 0.64^{***,###}	1077.39 \pm 0.13^{***,###}	1079.05 \pm 0.24[#]	1076.98 \pm 0.11^{***,###}
16	1046.06 \pm 0.15^{***}	1045.89 \pm 0.06^{***}	1045.86 \pm 0.06^{***}	1046.06 \pm 0.05^{***}	1046.24 \pm 0.13^{***}	1045.80 \pm 0.03^{***}	1046.49 \pm 0.16^{***}	1045.81 \pm 0.03^{***}
17	975.94 \pm 0.49	976.14 \pm 0.29	976.37 \pm 0.28	975.89 \pm 0.42	976.08 \pm 0.54	976.55 \pm 0.04	974.41 \pm 0.39	976.74 \pm 0.29

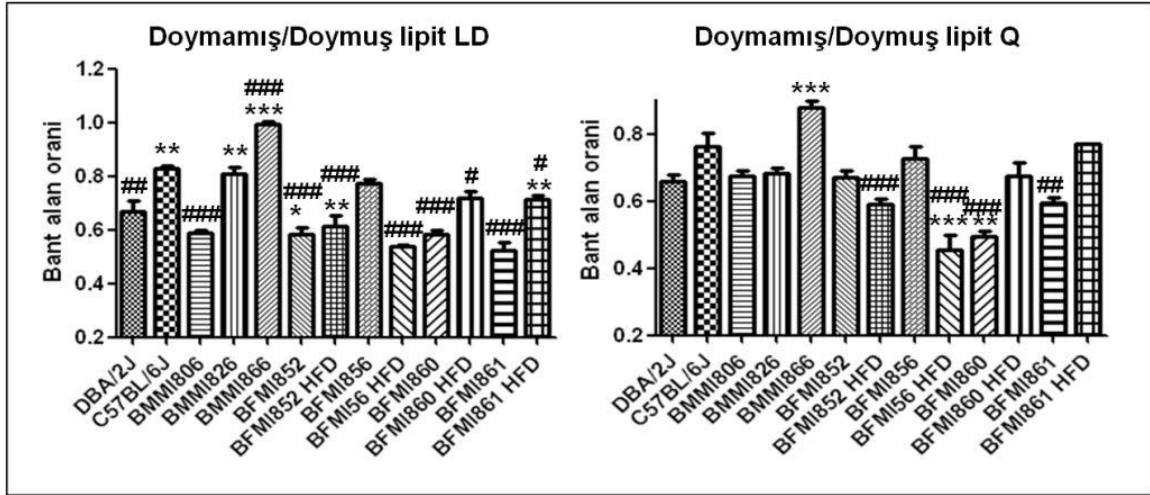
Tablo 11. SBD ile beslenmiş kontrol ve BMMI fare hatları Q iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların **frekans** değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak ifade edilmiştir.

Bant No	C57BL/6J (n=6)	DBA/2J (n=6)	BMMI NN806 (n=6)	BMMI CC826 (n=6)	BMMI CC866 (n=6)
Frekans					
2	3012.77 \pm 1.34	3016.18 \pm 0.18	3012.40 \pm 0.76	3013.84 \pm 1.35	3012.21 \pm 1.57*
3	2961.51 \pm 0.83	2959.64 \pm 0.19	2959.98 \pm 0.54	2959.17 \pm 0.28#	2961.16 \pm 0.58
4	2923.31 \pm 0.39	2923.62 \pm 0.31	2922.89 \pm 0.23	2923.51 \pm 0.18	2922.86 \pm 0.27
5	2873.26 \pm 0.16	2873.17 \pm 0.21	2873.33 \pm 0.14	2873.42 \pm 0.10	2872.90 \pm 0.06
6	2852.51 \pm 0.14	2852.65 \pm 0.15	2852.67 \pm 0.08	2852.78 \pm 0.21	2852.60 \pm 0.17
7	1741.61 \pm 0.56	1741.91 \pm 0.27	1741.43 \pm 0.83	1740.38 \pm 0.31	1741.21 \pm 0.51
8	1637.98 \pm 0.20	1638.60 \pm 0.12	1638.28 \pm 0.33	1638.07 \pm 0.20	1638.07 \pm 0.15
9	1547.01 \pm 0.15	1547.82 \pm 0.60	1547.74 \pm 0.83	1546.90 \pm 0.85	1546.83 \pm 0.42
10	1453.91 \pm 0.08	1454.71 \pm 0.28	1454.91 \pm 0.50	1454.63 \pm 0.49	1454.40 \pm 0.28
11	1397.86 \pm 0.63	1397.97 \pm 0.12	1397.99 \pm 0.10	1397.91 \pm 0.16	1397.63 \pm 0.20
12	1341.41 \pm 1.24	1342.24 \pm 0.82	1341.61 \pm 1.23	1342.87 \pm 1.05	1342.97 \pm 1.16
13	1239.96 \pm 0.05	1239.57 \pm 0.39	1240.57 \pm 0.17	1240.27 \pm 0.24	1240.34 \pm 0.22
14	1172.52 \pm 0.14	1172.61 \pm 0.18	1172.82 \pm 0.39	1172.45 \pm 0.20	1172.36 \pm 0.06
15	1080.90 \pm 0.29	1079.44 \pm 0.14	1079.33 \pm 0.24#	1079.24 \pm 0.23#	1079.78 \pm 0.22
16	1046.25 \pm 0.06	1046.89 \pm 0.15	1046.06 \pm 0.07**	1045.87 \pm 0.07***	1046.02 \pm 0.09**
17	974.62 \pm 0.64	975.88 \pm 0.39	975.61 \pm 0.32	975.06 \pm 0.37	975.58 \pm 0.36

Tablo 12. SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI fare hatları Q iskelet kas spektrumlarında görülen bazı bantların **frekans** değerleri arasındaki farklılıklar. Verilen değerler ortalama \pm ortalama standart hata olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık kontrol hatları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Verilen değer C57BL/6J fare hattına göre anlamlı ise #, DBA/2J fare hattına göre anlamlı ise * işareti ile gösterilmiştir. Anlamlılık derecesi ise her işaret için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ olarak ifade edilmiştir.

Bant No	BFMI852 SBD (n=6)	BFMI852 HFD (n=6)	BFMI856 SBD (n=6)	BFMI856 HFD (n=6)	BFMI860 SBD (n=6)	BFMI860 HFD (n=6)	BFMI861 SBD (n=6)	BFMI861 HFD (n=6)
Frekans								
2	3012.84 \pm 1.31	3009.66 \pm 0.29^{***}	3012.05 \pm 0.75[*]	3002.43 \pm 0.31^{***,###}	3011.23 \pm 0.92^{**}	3010.77 \pm 0.64^{**}	3013.48 \pm 0.96	3010.42 \pm 0.44^{***}
3	2960.57 \pm 0.73	2957.75 \pm 0.10^{###}	2960.37 \pm 0.59	2957.62 \pm 0.13^{*,###}	2960.39 \pm 0.99	2958.44 \pm 0.01^{##}	2959.83 \pm 0.38	2958.30 \pm 0.21^{##}
4	2923.26 \pm 0.32	2924.47 \pm 0.08	2922.47 \pm 0.84	2924.29 \pm 0.29	2923.73 \pm 0.11	2923.78 \pm 0.06	2923.04 \pm 0.27	2924.47 \pm 0.08
5	2873.40 \pm 0.17	2872.44 \pm 0.17 ^{**,##}	2873.41 \pm 0.11	2872.83 \pm 0.07	2872.89 \pm 0.24	2872.48 \pm 0.10^{**,##}	2873.20 \pm 0.10	2872.40 \pm 0.12^{**,##}
6	2852.62 \pm 0.14	2853.20 \pm 0.07^{**,#}	2852.28 \pm 0.21	2853.18 \pm 0.02^{*,#}	2852.80 \pm 0.10	2852.91 \pm 0.07	2852.51 \pm 0.16	2853.10 \pm 0.06[*]
7	1741.66 \pm 0.57	1742.11 \pm 0.56	1742.26 \pm 0.81	1742.03 \pm 0.33	1742.15 \pm 0.62	1742.80 \pm 0.12	1741.43 \pm 0.91	1741.89 \pm 0.53
8	1638.82 \pm 0.26	1638.44 \pm 0.12	1638.61 \pm 0.19	1638.46 \pm 0.16	1637.91 \pm 0.33	1637.72 \pm 0.40	1638.44 \pm 0.36	1638.23 \pm 0.15
9	1547.16 \pm 0.89	1548.73 \pm 0.71	1547.43 \pm 0.81	1547.88 \pm 0.45	1545.63 \pm 0.66	1545.44 \pm 0.87	1547.14 \pm 1.25	1546.50 \pm 0.16
10	1454.92 \pm 0.79	1454.43 \pm 0.43	1455.12 \pm 0.74	1455.21 \pm 0.49	1453.83 \pm 0.69	1453.82 \pm 0.38	1453.94 \pm 0.63	1454.17 \pm 0.13
11	1398.14 \pm 0.15	1398.11 \pm 0.05	1398.07 \pm 0.19	1397.77 \pm 0.10	1397.72 \pm 0.16	1397.53 \pm 0.27	1398.18 \pm 0.26	1398.05 \pm 0.02
12	1343.86 \pm 1.07	1339.61 \pm 0.02	1341.82 \pm 1.11	1342.75 \pm 0.62	1343.32 \pm 0.52	1343.16 \pm 0.39	1341.96 \pm 0.98	1342.73 \pm 0.23
13	1238.33 \pm 1.25	1240.29 \pm 0.30	1238.75 \pm 0.86	1238.40 \pm 0.52	1240.37 \pm 0.52	1240.05 \pm 0.19	1240.48 \pm 0.37	1240.33 \pm 0.18
14	1172.54 \pm 0.17	1172.76 \pm 0.11 ^{***,###}	1173.13 \pm 0.26	1172.45 \pm 0.06^{***,###}	1172.49 \pm 0.15	1172.53 \pm 0.08^{***,###}	1172.60 \pm 0.07	1172.44 \pm 0.07^{***,###}
15	1079.45 \pm 0.18[#]	1076.41 \pm 0.47^{***,###}	1079.43 \pm 0.22[#]	1076.94 \pm 0.15^{***,###}	1077.89 \pm 0.65^{**,###}	1077.69 \pm 0.11^{***,###}	1079.10 \pm 0.30^{##}	1078.88 \pm 0.44^{##}
16	1046.05 \pm 0.05^{**}	1046.12 \pm 0.04^{**}	1046.23 \pm 0.28[*]	1045.94 \pm 0.03^{***}	1046.33 \pm 0.11	1045.91 \pm 0.11^{***}	1046.46 \pm 0.15	1045.84 \pm 0.03^{***}
17	975.85 \pm 0.19	975.28 \pm 0.30	975.61 \pm 0.56	976.11 \pm 0.30	975.60 \pm 0.55	975.86 \pm 0.10	974.44 \pm 0.30	976.07 \pm 0.10

Doymamış yağ asitlerinde bulunan HC=CH gruplarının C-H bağlarındaki gerilme titreşimlerinden kaynaklanan ve 3010 cm⁻¹ frekans değerinde gözlenen bandın şiddeti veya altındaki alan hidrokarbon zincirlerinin doymuşluğu hakkında bilgi vermektedir (MELIN v.d., 2000; SEVERCAN v.d., 2005; ÇAKMAK v.d., 2006; TAKAHASHI v.d., 1991). Çalışma sonuçlarından her iki kasta da en düşük doymamış yağ içeriğinin BMMI806 ırkı olduğu görülmüştür (Tablo 5 ve 7). BFM ırkları arasında, her iki kasta da, en yüksek doymamış yağ içeriğine sahip olan ise BFMI856 olarak tespit edilmiştir (Tablo 6 ve 8). Farklı fare ırklarında doymamış lipidlerin doymuş lipidlere olan oranları olefinik bant alanının CH₂ antisimetrik ve simetrik gerilim bant alanları toplamına bölünmesi ile hesaplanmış ve elde edilen değerler Şekil 13’de verilmiştir. Bu oran doymamışlık indeksi olarak kullanılabilir (GASPER v.d., 2009). Şekilden de görülebileceği gibi, BFM ırkları arasında LD kasında en yüksek doymamış lipid indeksine sahip olan BFMI856 ırkıdır ve LD kasında BFMI860 ve BFMI861 ırkları, Q kasında da BFMI860 ırkı en düşük indeks değerine sahiptirler. BMMI ırklarında bu oran özellikle LD kasında BMMI806 ırkında en düşük değerdedir, BMMI866 ırkında ise en yüksek doymamışlık indeksi gözlenmiştir. HFD ile beslenmiş BFM ırklarında bu indeks değeri özellikle BFMI856 ırkında düşüş gösterirken BFMI860 ve 861 ırklarında artmıştır. Bunun nedeni HFD ile beslenmede doku içerisine daha fazla lipid alınması olabilir.



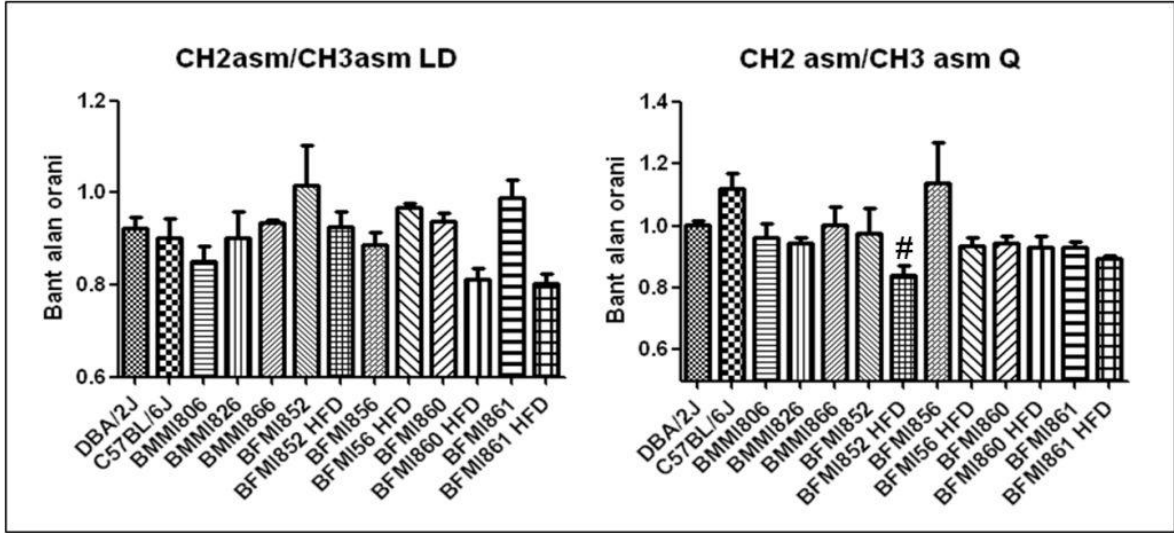
Şekil 13. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFM ırkları ile HFD ile beslenmiş BFM ırkları LD ve Q kaslarında doymamış/doymuş lipid oranında olan farklılıkları gösteren bar diagramları (Verilen değer DBA/2J ırkına göre anlamlı ise *, C57BL/6J ırkına göre anlamlı ise # işareti ile gösterilmiştir).

Olefinik bant alanında ve doymamış yağ asidi miktarının doymuş yağ asidi miktarına oranlanması ile görüntülenen doymamışlık indeksi dokulardaki lipit peroksidasyonu oranını tespit etmek amacıyla kullanılabilir. Olefinik bant alanında ve doymamış yağ asidi indeksindeki azalma ile tespit edilen lipitlerin içeriğindeki doymamış yağ asidi miktarının az olması daha yüksek oranda gerçekleşen lipit peroksidasyonunun bir sonucu olarak gözlenebilir (CURTIS v.d., 1984; BRUCH v.d., 1983). BMMI ırkları içerisinde BMMI806 ırkı ve BFMI ırkları içerisinde BFMI860 ve BFMI861 ırkları en düşük olefinik bant alanına ve doymamışlık indeksine sahip olduklarından her iki kasta da en düşük doymamış yağ asidi miktarına sahip olan ve lipit peroksidasyonuna en yatkın olan ırklardır.

CH₃ antisimetrik gerilme bandı lipitlerin asil zincirlerindeki metil grupları, CH₂ antisimetrik ve simetrik gerilim bandı ise lipitlerin asil zincirleri hakkında yapısal ve fonksiyonel bilgi vermektedirler (TAKAHASHI v.d., 1991; BOZKURT v.d., 2010). BFMI ırkları arasında kas lipit yapılarında en yüksek metilen grubuna sahip olanların Q kasında BFMI860, LD kasında ise BFMI860 ve BFMI861 ırkları olduğu görülmüştür. Bunun yanı sıra tüm ırklar içerisinde lipit yapılarında en yüksek metil grubuna sahip olan ırkın BFMI860 olduğu gözlenmiştir (Tablo 5-8). Lipit içeriğindeki metil ve metilen gruplarının toplam lipit içeriğine oranları sırasıyla Şekil 12B ve 12C'de görülmektedir. Şekillerde de görülebileceği gibi tüm lipitler içerisindeki metil grubu yoğunluğu LD kasında BFMI861 ırkında Q kasında ise BFMI856 ırkında en düşüktür. Metilen grubu yoğunluğu ise LD kasında HFD ile beslenmiş BFMI860 ve BFMI861 ırklarında en düşük olarak kaydedilmiştir.

Bu sonuçları daha iyi yorumlayabilmek için CH₂ antisimetrik gerilim bant alanının CH₃ antisimetrik gerilme bant alanına oranı hesaplanmıştır ve sonuçlar Şekil 14'de verilmiştir. Şekillerde de görüldüğü üzere bu oran, BFMI ırklarında LD kasında BFMI852 ve BFMI861 ırklarında Q kasında ise BFMI856 ırkında en yüksek olarak tespit edilmiştir. BMMI ırklarında bu oran her iki kasta da BMMI866 ırkında en yüksektir. Bu oranın yüksek olması bu ırklarda daha uzun hidrokarbon zincirli lipitlerin yer aldığını göstermektedir. LD kasında BMMI ırkları arasında en düşük CH₂ antisimetrik gerilim bant alanının CH₃ antisimetrik gerilme bant alanına oranına sahip olan ırk BMMI806 olarak, BFMI ırkları içerisinde de BFMI860 ve BFMI861 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, LD kasında BMMI806, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında daha kısa hidrokarbon zincirli lipitler bulunduğunu göstermektedir.

Dokularda artan lipit peroksidasyonu daha kısa zincirli lipitlerin miktarının artmasına neden olabilir (LEVINE ve WETZEL, 1994, BOZKURT v.d., 2010). Elde edilen sonuçlara göre, daha az doymamış yağ asidi miktarına ve daha fazla kısa zincirli lipit içeriğine sahip olan ırklar BMMI ırklarından BMMI806 ve BFMI ırklarından BFMI860'dır. Bu sonuçlar göz önüne alındığında incelenen ırklar arasından lipit peroksidasyonuna en yatkın olan ırkların BMMI806 ve BFMI860 olduğu söylenebilir.



Şekil 14. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında hidrokarbon zincir uzunluğundaki farklılıkları (CH₂ antisimetrik gerilim bant alanı/CH₃ antisimetrik gerilim bant alanı) gösteren bar diagramları (Verilen değer DBA/2J ırkına göre anlamlı ise *, C57BL/6J ırkına göre anlamlı ise # işareti ile gösterilmiştir).

Biyolojik membranların yapısında bulunan fosfolipitlerin çoğunluğunu oluşturan çoklu doymamış yağ asitleri serbest radikallerle etkileşime girmeye yatkınlardır. Serbest radikaller bu yağ asitlerinin çift bağları ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonuna neden olurlar. Gerçekleşen bu lipit peroksidasyonu lipit yapısındaki doymamış bağların azalmasına, doymamış lipit içeriğinin azalmasına ve uzun zincirlerin daha kısa yapıllı zincirlere kırılmasına yol açar (LEVINE v.d., 1998; OLUSI, 2002). Bu nedenle gerçekleşen lipit peroksidasyonu membranın doymamış/doymuş lipit oranında değişikliğe, membranda çapraz bağlanmış lipit-lipit ve protein-lipit kısımlarının oluşmasına neden olarak daha katı, esnekliği azalmış bir membran yapısı oluşmasına yol açar (NIRANJAN v.d., 2000). Oluşan bu daha az esnek membran insülinin reseptörüne doğru ve etkin biçimde bağlanmasında bazı sınırlamalar yaratabileceğinden insülin direnci oluşumunda katkıda bulunabilir (RUSSO, 2009). Ayrıca, membran yapısında bulunan uzun zincirli

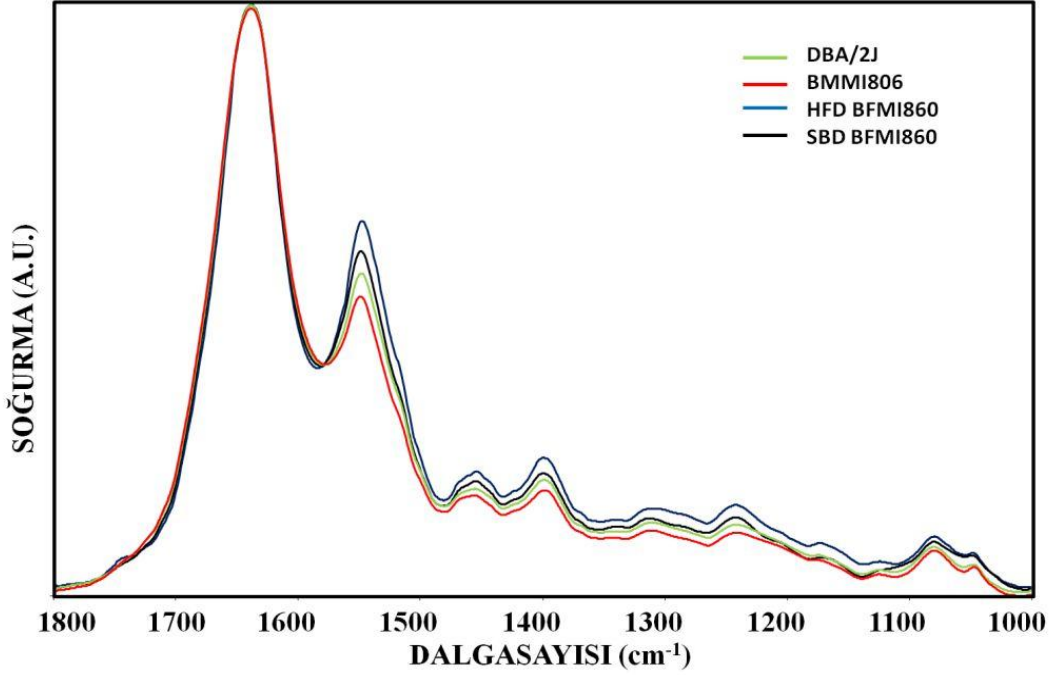
çoklu doymamış yağ asitlerinin miktarının artmasının hücrede bulunan insülin reseptör sayısında ve insülin yoluyla gerçekleşen glikoz taşınmasında değişikliklere neden olabilecekleri için insülin duyarlılığını artırabilecekleri öne sürülmüştür (STORLIEN v.d., 1991; AYRE v.d., 1998). Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre BMMI806, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında daha az doymamış lipid içeriğine ve daha kısa zincirli lipid içeriğine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu sonuç bu ırklarda daha yüksek oranda insülin direnci oluşmuş olabileceğini önermektedir. Gerçekten de bu ırklardan BFMI860 ve BFMI861 ırklarının insüline enjeksiyonuna daha yavaş ve geç cevap verdikleri belirlenmiştir.

Olefinik=CH bandın frekans değerinde görülen düşük değerlere kayma membranda bulunan doymamış yağ asitlerinin daha düzenli bir yapıda bulduklarını göstermektedir (BIZEAU v.d., 2000; SEVERCAN v.d., 2003; BOZKURT v.d., 2010, ÇAKMAK v.d., 2011). Tablo 9 ve 10'da görüldüğü gibi LD kasında BMMI ırkları içerisinde BMMI866 ırkında, BFMI ırklarında ise BFMI852, BFMI856 ve BFMI860 ırklarında bu bandın frekans değeri düşük olarak gözlenmiştir. Yine LD kasında HFD ile beslenmiş BFMI ırklarında, özellikle BFMI852, BFMI856 ve BFMI860 ırklarında olefinik bant frekansı daha düşük değerlere kaymıştır. Q kasında ise BMMI ırkları içinde BMMI866'da, BFMI ırkları içinde BFMI856 ve BFMI860 ırklarında, HFD ile beslenmiş BFMI ırklarında tüm ırklarda, özellikle BFMI856 ırkında olefinik bant alanı düşük değerlere kaymıştır (Tablo 11 ve 12). Bu sonuç, her iki kasta da BMMI866, BFMI856 ve BFMI860 ırklarında ve HFD ile beslenmiş BFMI ırklarında doymamış yağ asitlerinin daha düzenli bir yapıda olduğunu göstermektedir.

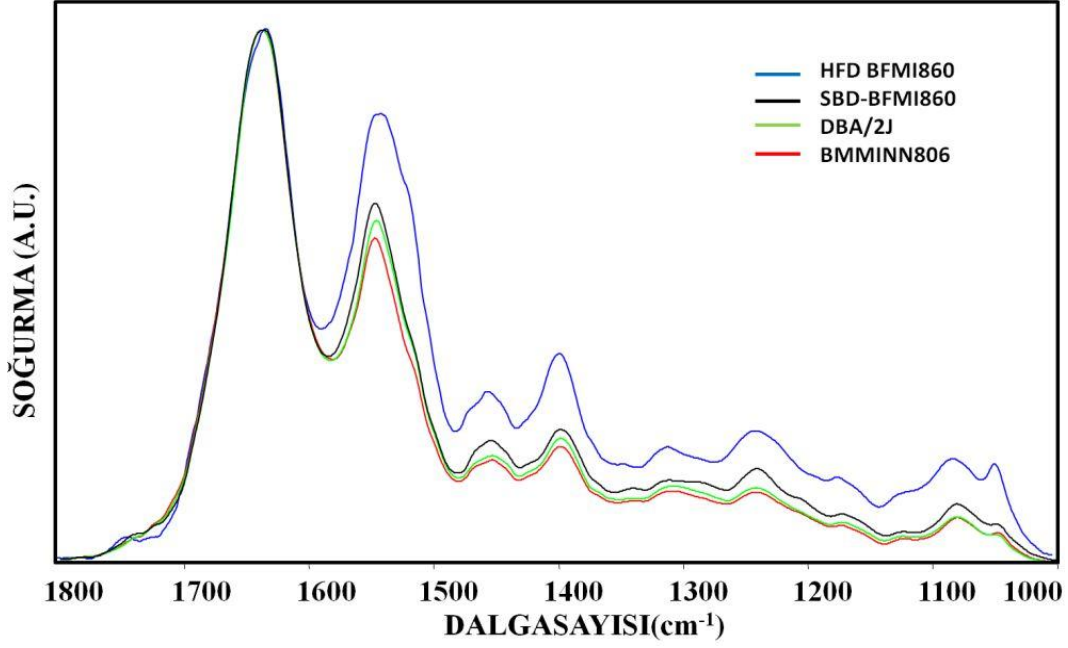
CH₂ antisimetrik ve simetrik bantlarının pozisyonları, lipid asil zincirlerinin esnekliği, yani lipidlerin konformasyonel düzensizlikleri hakkında bilgi vermektedir (UMEMURA v.d. 1980; CASAL v.d., 1980; BOYAR v.d., 1997). Bu bantların frekanslarında görülen düşük değerlere kayma, sistemdeki asil zincirlerinin daha düzenli olduğu, yani trans/gauche oranının arttığı anlamına gelmektedir (LIU v.d. 2002; MANTSCH, 1984; SEVERCAN v.d. 1997; OZEK v.d., 2009; BOZKURT v.d., 2010; ÇAKMAK v.d., 2011). Frekansta gözlenen yüksek değere kayma ise, asil zincirlerinin düzensizliğinin arttığını, dolayısıyla trans/gauche oranının azaldığını göstermektedir (MANTSCH, 1984). Tablo 9-12'de görüldüğü gibi, CH₂ antisimetrik gerilim bandının frekans değerinde her iki kasta da anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. CH₂ simetrik gerilim bant frekansının Q kasında HFD ile beslenmiş BFMI852, BFMI856 ve BFMI861 ırklarında, LD kasında sadece HFD ile beslenmiş BFMI852 ve BFMI856

ırklarında yüksek değerlere kaydığı gözlenmiştir. Bu sonuç, HFD ile beslenen gruplarda asil zincirlerinin daha düzensiz bir yapıda olma eğiliminde olduklarına işaret etmektedir.

Şekil 15 ve 16, SBD ile beslenmiş kontrol DBA/2J, BMMI806, BFMI860 ve HFD ile beslenmiş BFMI860 fare ırklarının sırasıyla LD ve Q iskelet kas dokularının 1800 – 1000 cm^{-1} bölgesindeki ortalama FTIR spektrumlarını göstermektedir. Gruplar arasında görsel karşılaştırma yapabilmek için spektrumlar amid I bandına göre normalize edilmiştir.

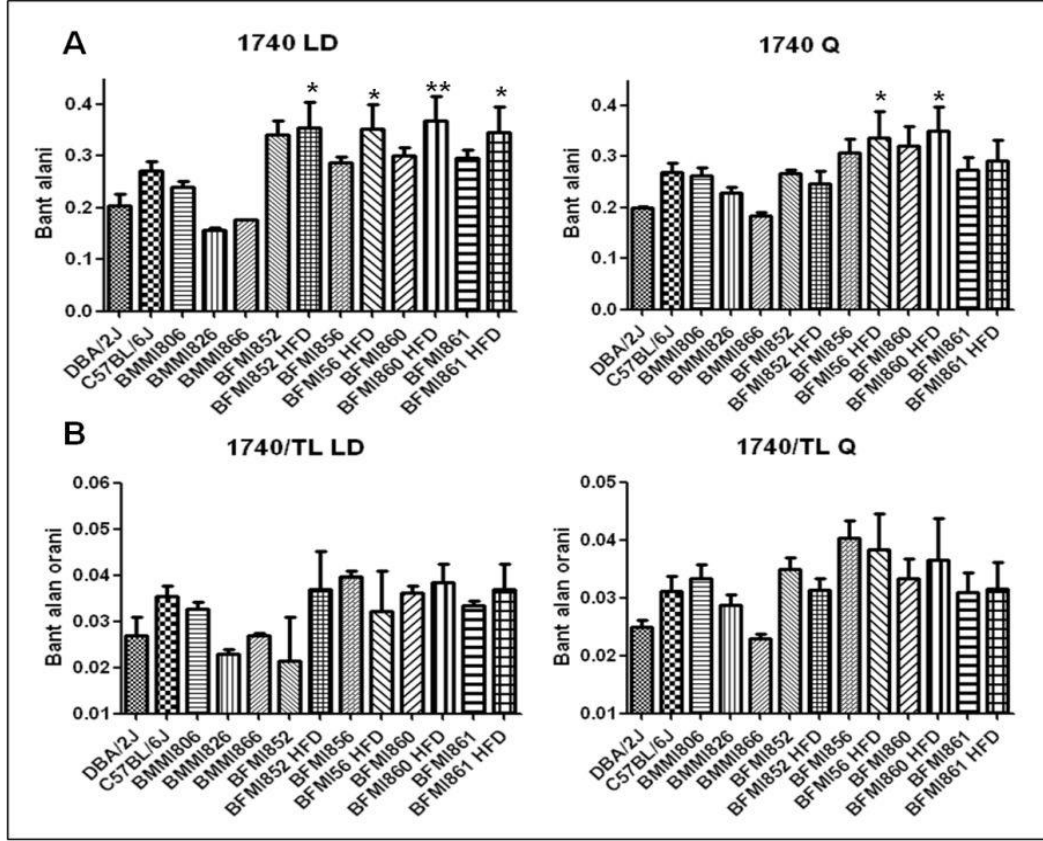


Şekil 15. SBD ile beslenmiş kontrol DBA/2J, BMMI806, BFMI860 ve HFD ile beslenmiş BFMI860 fare ırkları LD kas dokularına ait 1800-1000 cm^{-1} frekans aralığında Amid I bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.



Şekil 16. SBD ile beslenmiş kontrol DBA/2J, BMMI806, BFMI860 ve HFD ile beslenmiş BFMI860 fare ırkları Q kas dokularına ait 1800-1000 cm^{-1} frekans aralığında Amid I bandına göre normalize edilmiş ortalama spektrumlar.

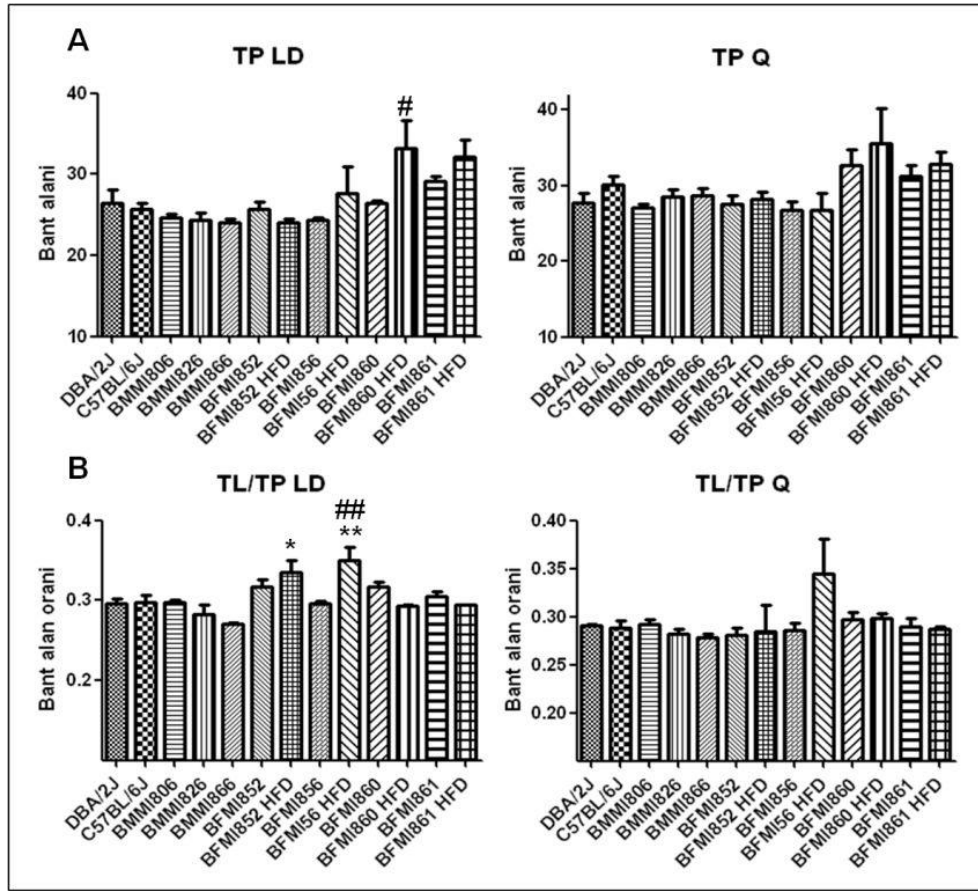
Spektrumların 1800-1000 cm^{-1} bölgeleri parmak izi bölgesi olarak da adlandırılır. Bu bölgede bulunan ve 1740 cm^{-1} 'de görülen C=O gerilme titreşim bandı trigliserit ve kolesterol esterlerinden kaynaklanır. Bu bant alanında gözlenen farklılıklar Şekil 17A'da gösterilmiştir. Şekil 17A ile Tablo 5-8'de görüldüğü gibi her iki kasta, özellikle LD kasında da trigliserit ve kolesterol ester miktarı BFMI ırklarında BMMI ırklarına nazaran daha yüksektir. HFD ile beslenmiş BFMI ırklarında ise trigliserit ve kolesterol miktarı daha da artmaktadır. Şekil 17B'de ester C=O gerilme titreşiminden kaynaklanan bant alanının toplam lipid miktarına bölünmesi ile elde edilen ve tüm lipidlerin içerisindeki karbonil miktarını gösteren oran görülmektedir. LD kasında bu oranın BFMI852 hariç BFMI ırklarında daha yüksek olarak gözlenmesi BFMI ırklarının lipid içeriklerinin büyük bir bölümünün trigliserit ve kolesterol esterlerden oluştuğuna işaret etmektedir.



Şekil 17. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında A) karbonil grubu miktarında, B) tüm lipitlerin içerisinde bulunan karbonil miktarında olan farklılıkları gösteren bar diagramları (Verilen değer DBA/2J ırkına göre anlamlı ise *, C57BL/6J ırkına göre anlamlı ise # işareti ile gösterilmiştir).

Bu bölgede bulunan 1638 cm^{-1} frekansındaki proteinlerden kaynaklanan amid I bandı %80 oranında C=O gerilme, %10 oranında C-N gerilme ve %10 oranında N-H bükülme titreşimlerinden, 1545 cm^{-1} frekansındaki yine proteinlerden kaynaklanan amid II bandı ise %60 oranında N-H bükülme ve %40 oranında C-N gerilme titreşimlerinden kaynaklanır (TAKAHASHI v.d., 1991; WONG v.d., 1991; STUART, 1997; HARIS and SEVERCAN, 1999; CAKMAK v.d., 2006; BOZKURT v.d., 2010). Şekil 18A'da amid I ve amid II bantların alanlarının toplanması ile elde edilen toplam protein miktarının değişimi gösterilmektedir. Ayrıca, Şekil 18B'de de total lipit miktarının total protein miktarına bölünmesi ile elde edilen lipit/protein miktarının değişimini gösteren oran görülmektedir. Şekilden görülebileceği üzere, BFMI860 ve BFMI861 ırkları diğer BFMI ırklarına göre daha fazla protein içeriğine sahiptir. HFD ile beslenmiş BFMI ırklarından ise BFMI860 ırkında en yüksek protein içeriği tespit edilmiştir, fakat hem BFMI860 hem BFMI861 ırklarında daha yüksek oranda protein içeriği olduğu söylenebilir. Buna karşın

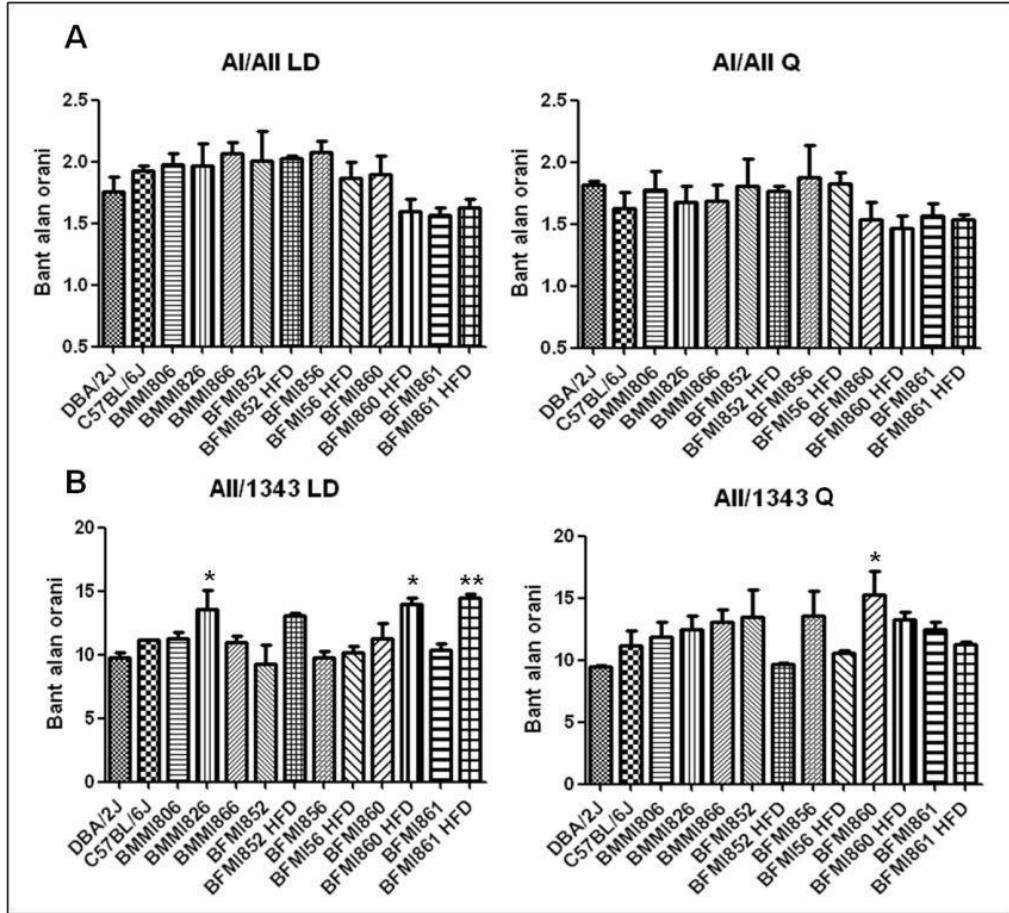
bu ırklarda daha fazla lipit içeriği de olduğundan lipit/protein oranı diğer BFMI ırklarına göre azalmaktadır (Şekil 18B). Bunun yanı sıra, lipit/protein oranı en yüksek olan ırk BFMI856'dır (Şekil 18B). LD kasında total lipit ve total protein miktarlarının BFMI860 ve BFMI861 ırklarında en yüksek olduğu düşünülürse, lipit/protein oranının yine bu ırklarda biraz düşmesi lipit içeriğinin protein içeriğine nazaran daha düşük olduğunu göstermektedir. Aynı durum Q kasında BFMI860 ve BFMI861 ırkları için mevcut bulunmakla birlikte bu kas için anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir.



Şekil 18. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında A) total protein, B) total lipit/total protein oranında gözlenen farklılıkları gösteren bar diagramları (Verilen değer DBA/2J ırkına göre anlamlı ise *, C57BL/6J ırkına göre anlamlı ise # işareti ile gösterilmiştir).

Amid I ve amid II bandları titreşim frekansları protein ikincil yapılarındaki olası değişimleri hakkında bilgi verir (HARIS ve SEVERCAN, 1999; JACKSON v.d., 1998, LYMAN v.d., 1999). İncelen ırklarda amid I bant frekansı 1638 cm^{-1} civarında tespit edilirken amid II bant frekans değeri yaklaşık 1547 cm^{-1} civarında gözlenmiştir. İrklar arasında protein bant frekans değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemesine karşın

BFMI852 ırkında LD kasında amid I bandı frekans değeri biraz daha yüksek bir değerde tespit edilmiştir (Tablo 9 ve 10). Protein yapılarında bir farklılık olup olmadığı hakkında bilgi edinebilmek için birbirinden farklı oranlarda C=O, N-H ve C-N titreşimlerinden kaynaklanan amid I bant alanı, amid II bant alanına oranlanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 19A'da gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi, bu oranın özellikle LD kasında BFMI860 ve BFMI861 ırkında diğer tüm ırklardan daha farklı olduğu bulunmuş fakat anlamlı bir değişim elde edilememiştir. Bu sonuçlar, protein ikincil yapılarında bir değişimin olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 19. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında A) amid I/amid II oranında, B) amidII/1343 oranında gözlenen farklılıkları gösteren bar diagramları (Verilen değer DBA/2J ırkına göre anlamlı ise *, C57BL/6J ırkına göre anlamlı ise # işareti ile gösterilmiştir).

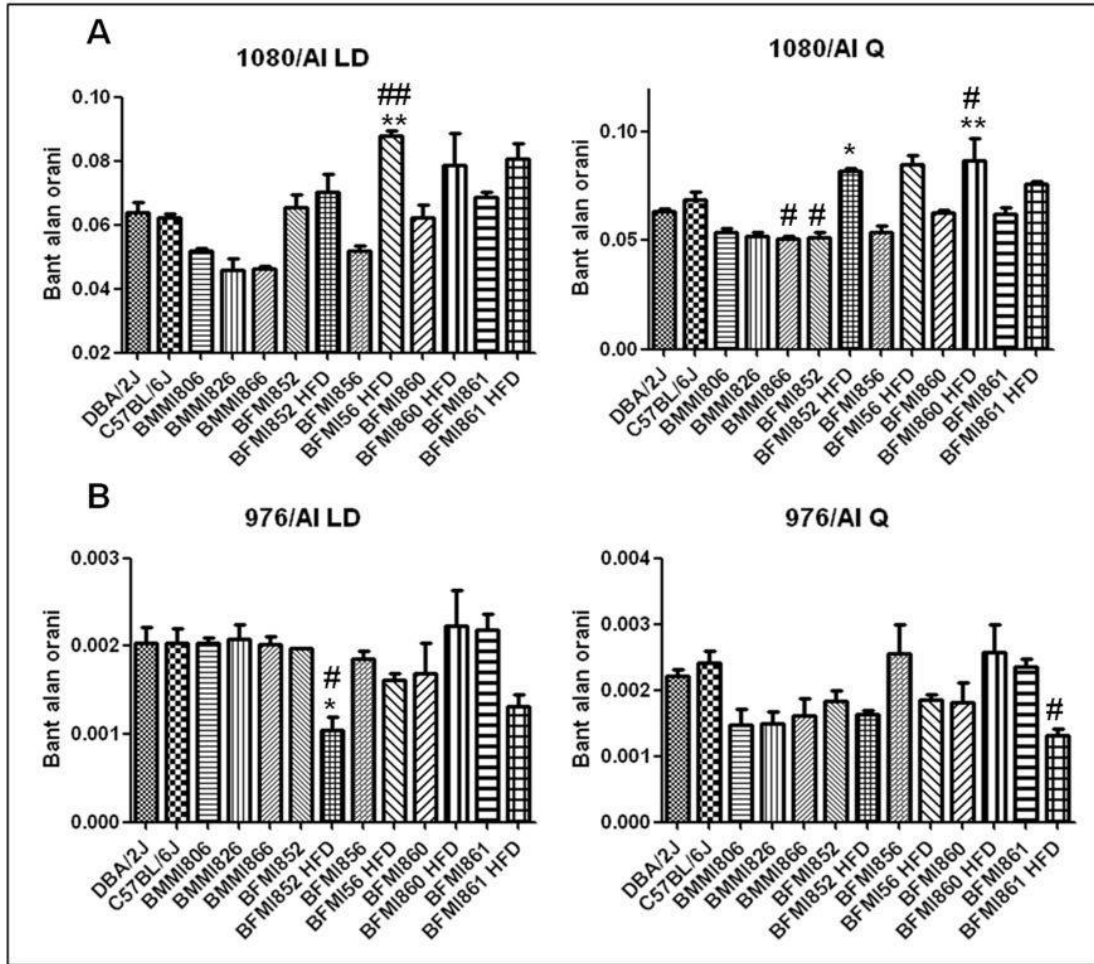
CH₂ kolajen yan zincir titreşimlerinden kaynaklanan (CAMACHO v.d., 2001, GOUGH v.d., 2003; WEST v.d., 2004) 1343 cm⁻¹ bandı alanı LD kasında BFMI ırklarında, özellikle BFMI860 ve BFMI861 ırklarında daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Tablo 5 ve 6). Bu sonuç, BFMI ırkları LD kaslarında daha yüksek protein içeriği bulunduğu sonucunu

desteklemektedir. Bu bant, ayrıca kolajen moleküllerinin üçlü sarmal heliks yapısının düzenini izlemek için kullanılabilir (WEST v.d., 2004; BOZKURT v.d., 2010). Amid II bant alanının 1343 cm^{-1} bandı alanına oranlanması ile elde edilen oran kolajen moleküllerinin yapı bütünlüğü hakkında bilgi vermektedir (WEST v.d., 2004) ve bu oranla ilgili elde edilen sonuçlar Şekil 19B'de gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere, LD kasında BMMI ırkları içinde en yüksek amid II/ 1343 cm^{-1} oranına sahip olan ırk BMMI826, BFMI ırkları arasında ise BFMI860'dır. Q kasında BFMI ırkları arasında bu oran en yüksek olarak BFMI860 ırkında gözlenmiştir. LD kasında HFD ile beslenmiş BFMI ırkları içerisinde bu oran BFMI860 ve BFMI861 ırklarında en yüksek değerde gözlenmiştir. Bu oranın yüksek olarak tespit edilmesi, kolajen yapı bütünlüğünün değiştiği ve kolajen kalitesinin azaldığını göstermektedir (WEST v.d., 2004).

Spektrumların $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığındaki bantlar daha ziyade nükleik asit ve fosfolipit gibi fosfat (PO_2^-) grupları içeren sistemlerin içindeki $\text{P}=\text{O}$ bağının soğurma bantlarından oluşmaktadır (DIEM v.d., 1999; LIQUIER ve TAILLANDIER, 1996; ÇAKMAK v.d., 2006; BOZKURT v.d., 2010; ÇAKMAK v.d., 2011). Bu bantlar, membranlardaki fosfolipitlerin kafa grupları hakkında önemli bilgiler de vermektedir (MENDELSON ve MANTSCH, 1986; BOZKURT v.d., 2010; ÇAKMAK v.d., 2011). Bu bantların frekanslarındaki artışlar nükleik asitlerin içeriğindeki ve fosfolipitlerin kafa gruplarındaki fosfat gruplarının yapmış oldukları hidrojen bağlarının zayıfladığı ve lipit sisteminin düzensizliğinin arttığı anlamına gelebilir (DOVBESHKO v.d., 2000). Tablo 9-12'de görüldüğü gibi, 1080 cm^{-1} 'de görülen PO_2^- simetrik gerilim bandı frekans değeri her iki kasta da BFMI ırklarında, özellikle BFMI860 ırkında daha düşük değere kaymıştır. Bu bulgu, BFMI860 ırkı nükleik asit (DNA ve RNA) yapılarında muhtemelen hidrojen bağlarının artması nedeniyle oluşan bir değişiklik olduğunu göstermektedir (DOVBESHKO v.d., 2000). Ayrıca, bu kayma membrandaki fosfolipitlerin kafa gruplarındaki fosfat gruplarının yapmış oldukları hidrojen bağlarının arttığını ve lipit sisteminin düzenliliğinin arttığını gösterir.

İncelenen ırkların LD kaslarında BFMI852, BFMI860, ve BFMI861 ırklarında, Q kaslarında ise BFMI860 ve BFMI861 ırklarında PO_2^- simetrik gerilim bant alanını en yüksek olarak tespit edilmiştir (Tablo 5-8). Bu sonuç, belirtilen ırkların bu kaslarda nükleik asit ve membranlardaki fosfolipitlerin miktarlarının daha yüksek olduğunu göstermektedir. BMMI ırklarında bu bandın alanı kontrollere nazaran daha düşük olarak tespit edilmiştir. PO_2^- simetrik gerilim bant alanının amid I bant alanına bölünmesi ile elde edilen nükleik asit/protein oranında elde edilen değişimler Şekil 20A'da gösterilmiştir. Şekilden de

görülebileceği üzere, LD kasında BFMI852, BFMI860, ve BFMI861 ırklarında, Q kaslarında ise BFMI860 ve BFMI861 ırklarında bu oran en yüksek olarak gözlenmiştir. HFD ile beslenmiş BFMI ırklarından LD kasında BFMI856, BFMI860 ve BFMI861 en yüksek nükleik asit/protein oranına sahip olurken, Q kasında BFMI852, BFMI856 ve BFMI860 en yüksek nükleik asit/protein oranına sahiptir. Bu sonuç, bu ırklarda artan protein sentezine işaret etmektedir.

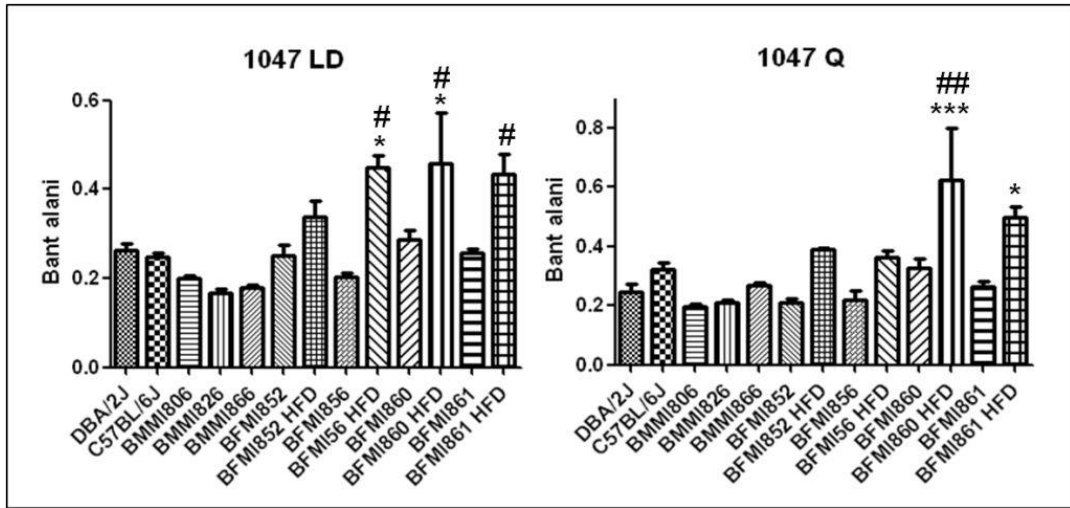


Şekil 20. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında A) nükleik asit/protein oranında, B) RNA/protein oranında olan farklılıkları gösteren bar diagramları (Verilen değer DBA/2J ırkına göre anlamlı ise *, C57BL/6J ırkına göre anlamlı ise # işareti ile gösterilmiştir).

976 cm^{-1} frekans değerinde gözlenen C-N+-C gerilme titreşim bandı nükleik asitlerden, özellikle de RNA riboz-fosfat ana zincir titreşimlerinden kaynaklanmaktadır (CHIRIBOGA v.d. 2000; BANYAY v.d., 2003). Bu bandın alanında ırklar arası anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 5-8). 976 cm^{-1} bant alanının amid I bant alanına oranlanması ile elde edilen RNA/protein oranındaki değişimler Şekil 20B'de gösterilmiştir.

Şekilde de görüldüğü üzere bu oran LD kasında BFMI861 ırkında en yüksek olarak gözlenmiştir. Bu sonuç, LD kasında BFMI861 ırkında artan RNA miktarını ve protein sentezinde bir artım olduğunu göstermektedir. Fakat HFD ile beslenmiş BFMI ırklarında bu oran BFMI860 ırkında en yüksek olarak kaydedilmiştir.

PO_2^- simetrik gerilim bandının hemen yanında 1047 cm^{-1} 'de görülen ve karbonhidratlardan, özellikle glikojenden kaynaklanan (CAKMAK v.d., 2003; CAKMAK v.d., 2006) bantın alanının incelenen tüm ırklar karşılaştırıldığında LD kaslarında BFMI852, BFMI860, ve BFMI861 ırklarında, Q kaslarında ise BFMI860 ve BFMI861 ırklarında en yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 21). HFD ile beslenmiş BFMI ırklarında, bu bantın alanı LD kasında BFMI856, BFMI860 ve BFMI861 ırklarında; Q kasında ise BFMI860 ve BFMI861 ırklarında en yüksek olarak gözlenmiştir. Bu da bize, özellikle BFMI860 ve BFMI861 ırklarında her iki kasta da karbonhidrat ve glikojen miktarının fazla olduğunu göstermektedir.



Şekil 21. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD ve Q kaslarında glikojen miktarında gözlenen farklılıkları gösteren bar diagramları (Verilen değer DBA/2J ırkına göre anlamlı ise *, C57BL/6J ırkına göre anlamlı ise # işareti ile gösterilmiştir).

Görüldüğü gibi, yapılan ATR-FTIR spektroskopisi çalışmaları sonucunda karmaşık genetik yapıya sahip inbred BMMI ve BFMI fare ırkları makromoleküler yapılarının en çok LD kaslarında farklılık gösterdiği, incelenen ırklardan BMMI806 ırkının ve SBD ya da HFD ile beslenen BFMI ırklarının, özellikle de BFMI860 ve BFMI861 ırklarının spektral parametrede en belirgin farklılıkları gösterdikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, özellikle LD kasında protein sentezi miktarı, glikojen, lipit, trigliserit ve protein gibi makromoleküllerin içerikleri gibi parametrelerde artım gözlenmiştir.

İskelet kasının içerisindeki kas lifi tiplerinin çeşitleri o kasın metabolik özelliklerini belirler. Buna ilaveten, kas içeriğindeki kas lifi çeşitleri o kasın çeşidi, yeri ve görevi gibi etmenlerden etkilenir (LEFAUCHEUR ve GERRARD 1998). Kas lifi çeşitleri aynı kas grubu içerisinde farklı yerlerde bile değişebilir (HAMELIN v.d., 2007). Vücudun duruş halini sağlamakla görevli olan ve daha derinde yer alan kaslar, yüzeyde yer alan ve daha çok hızlı hareketlerden sorumlu kaslara nazaran daha fazla oksidatif kas liflerine sahiptirler (ONO v.d., 1995). Bu çalışmanın sonucuna göre, vücudun duruşundan sorumlu olan (ONO v.d., 1995) ve daha fazla tip IIa kas lifi içerdiği rapor edilen (HAMELIN v.d., 2007) LD kasında incelenen parametrelerde daha anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

İncelenen spektral bölgelerde, özellikle lipit katkısı yüksek olan bantların frekans ve alan değerlerinde görülen farklılıklar, bu fare modellerinde, özellikle LD kas dokularında, lipit asil zincir yapıları, doymuş ve doymamış lipit içerikleri, trigliserit ve kolesterol ester miktarları gibi farklılıklar olduğunu göstermektedir. Bu farklılıkların daha kesin bir şekilde tayin edilebilmesi için fare modelleri kas dokularındaki lipit içeriği ve miktarları HPLC tekniği ile ayrıntılı olarak belirlenmiştir.

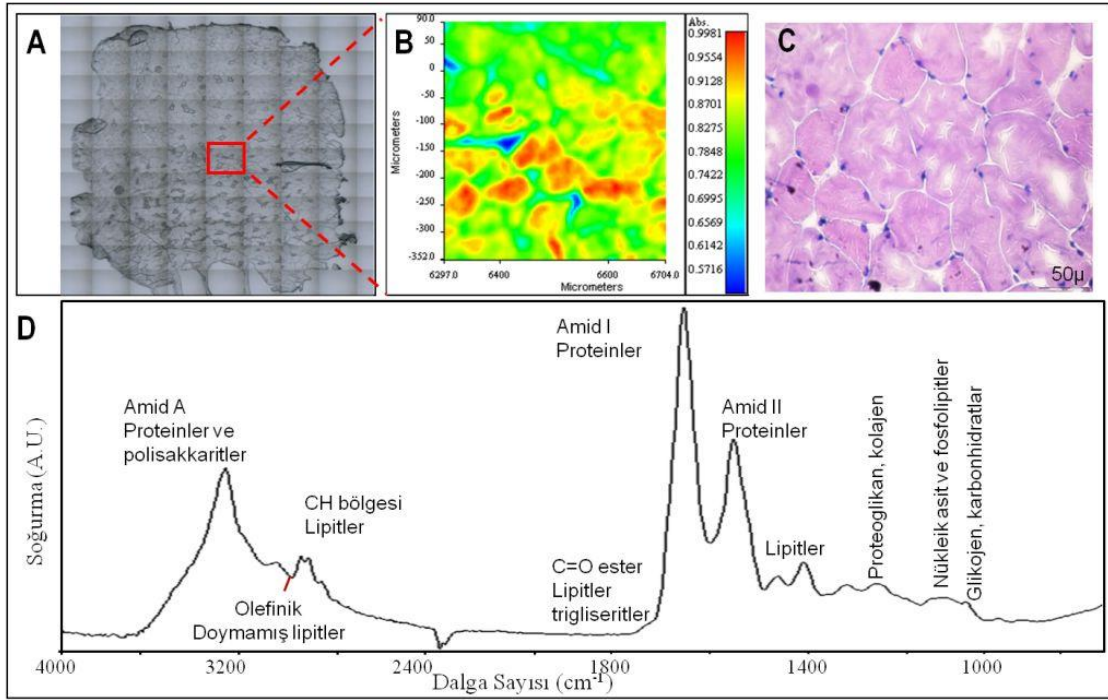
Ayrıca, tüm bu parametrelerde tespit edilen bu farklılıkları daha iyi açıklayabilmek için projenin devamında örnekler FTIR mikrospektroskopisi ve konfokal mikroskopisi görüntüleme teknikleri ile incelenmiş, görsel olarak gruplar arası farklılıklar ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Daha pahalı, uzun veri toplama süresine sahip ve analizi için de daha fazla süreye ihtiyaç duyulan görüntüleme çalışmaları için incelenen parametrelerde daha fazla etki tespit edilen BFMI856, BFMI860 ve BFMI861 BFMI ırkları, tüm BMMI ırkları ve daha az trigliserit, doymamış lipit içeriğine sahip olduğundan daha uygun bir kontrol grubu oluşturduğu düşünülen DBA/2J ırkı LD ve Q kasları kullanılmıştır.

4.3. Görüntüleme teknikleri ile yapılan çalışmalar

4.3.1. FTIR mikrospektroskopisi çalışmaları

Çalışmamızda kontrol, BMMI ve BFMI ırkları LD ve Q iskelet kasları içeriğindeki makromoleküllerin, özellikle lipitlerin dağılımının ve farklı özellikte lipitlerin buldukları yerleri tespit etmek için FTIR mikrospektroskopisi tekniği kullanılmıştır. Şekil 22’de FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş kesit görüntüsü (A), seçilen bir bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (B), bu kesitin hematoksilen eozin

boyamasından sonra 40X'lik objektif ile toplanan ışık mikroskobu görüntüsü (C), ve elde edilen spektral haritadan çıkarılan örnek bir iskelet kası spektrumu (D) görülmektedir.

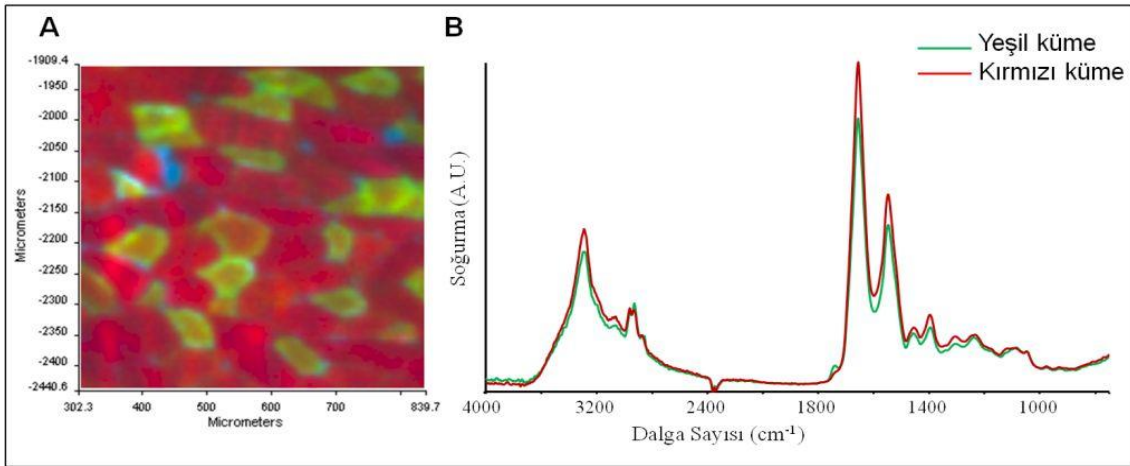


Şekil 22. Örnek bir kontrol (DBA/2J) LD iskelet kası enine kesitinden FTIR mikroskobunun ışık mikroskobu fonksiyonu ile elde edilmiş kesit görüntüsü (A), kırmızı ile işaretlenmiş bölgeden toplanmış toplam soğurma spektral haritası (B), bu kesitin hematoxilen eozin boyamasından sonra 40X'lik objektif ile toplanan ışık mikroskobu görüntüsü (C), ve elde edilen spektral haritadan çıkarılan örnek bir iskelet kası spektrumu (D) görülmektedir.

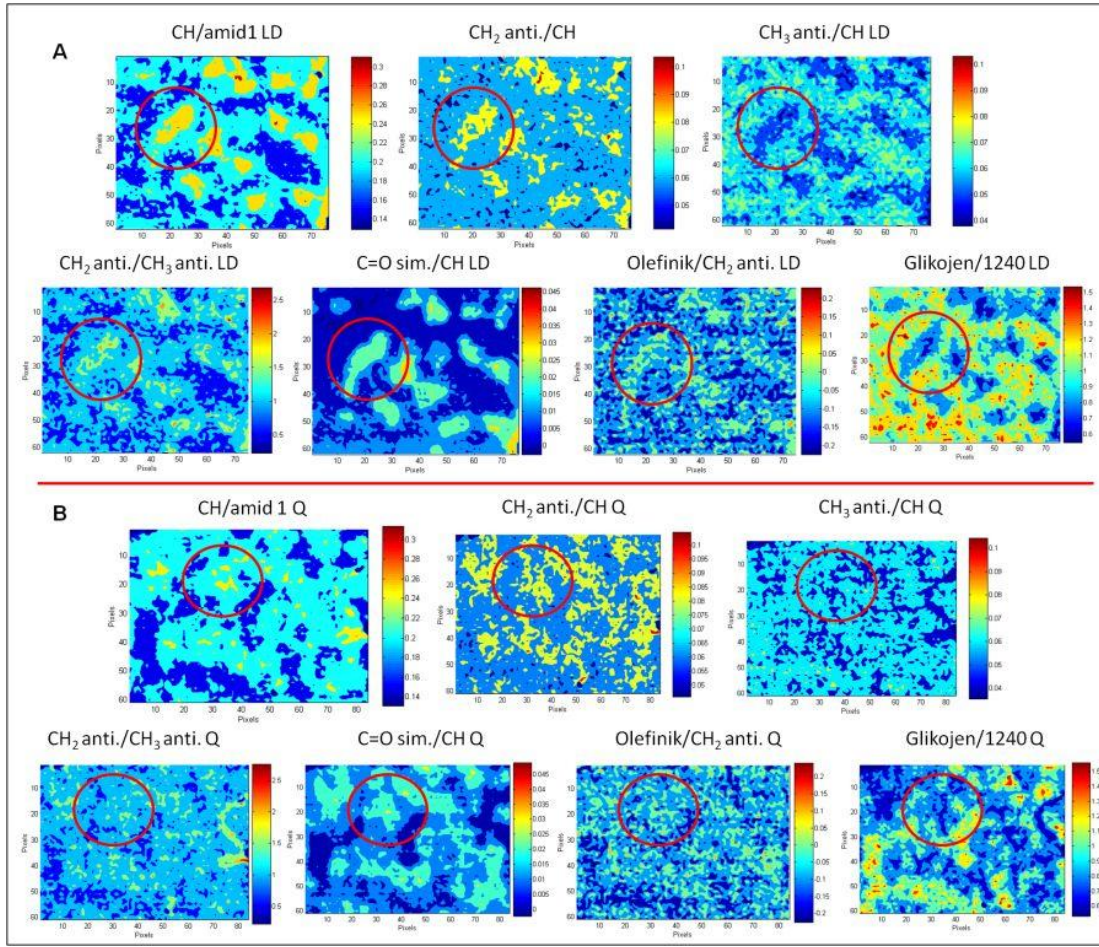
Toplanan spektral haritalar üzerinde özel analiz programı yardımı ile yapılan yapısal farklılıkları görmeye yönelik kümeleme analizinin sonuçları Şekil 23'te görülmektedir. Bu analiz sonucunda incelenen iskelet kas kesitleri içerisinde farklı özellikte spektrumlara sahip değişik bölgeler bulunduğu gözlenmiştir. Haritalarda temel olarak iki farklı spektrum gözlenmiştir. Bunlardan birinin daha fazla CH_2 antisimetrik gerilim bant alanı ve trigliserit bant alanına, dolayısıyla daha fazla lipit içeriğine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 23B, yeşil spektrum). Farklı kas lifi tiplerinde değişik miktarlarda lipit depolandığı, özellikle incelen LD ve Q kaslarında görülen tip IIa ve tipIIa ile IIb arası özellik gösteren kas liflerinde (ara tip lifler, intermediate) daha fazla lipit depolandığı konfokal mikroskopisi çalışmaları ile de ileriki bölümde rapor edildiği üzere tespit edilmiştir. FTIR mikrospektroskopik çalışmalarımızda gözlenen lipitlerden kaynaklı

bant alanları daha yüksek olan bu farklı liflerin de tip IIa ve ara tip kas lifleri olduğu belirlenmiştir.

Gözlenen bu farklılıkların daha detaylı olarak incelenmesi için haritalar üzerinde daha evvel bahsedilen (Tablo 3) bazı bant alan oranları hesaplanmıştır. Buna göre, kesitlerdeki lipid/protein dağılımı (CH/amid 1), lipid içeriğindeki metilen grubu dağılımı (CH₂ antisimetrik gerilim/CH), lipid içeriğindeki metil grubu dağılımı (CH₃ antisimetrik gerilim/CH), lipidlerin hidrokarbon zincir uzunluğu dağılımı (CH₂ antisimetrik gerilim/CH₃ antisimetrik gerilim), lipidlerdeki karbonil grubu dağılımı (C=O simetrik gerilim/CH), doymamış/doymuş lipidlerin dağılımı (olefinik/CH₂ antisimetrik gerilim) ve kesitlerde mevcut olan glikojen dağılımı 1047 cm⁻¹'de bulunan glikojenden kaynaklı bant alanının proteoglikanların sülfat gerilim ve kolajenin amid III titreşimlerinden kaynaklanan ve ATR-FTIR spektroskopisi çalışmasında gruplar arası anlamlı bir değişim göstermeyen 1240 cm⁻¹'de yer alan bant alanına oranlanarak (glikojen/1240 cm⁻¹) hesaplandı. Şekil 24'te kontrol DBA/2J iskelet kas kesitlerinde hesaplanan bu bant alanı oranı sonuçları sırasıyla LD ve Q kasları için görülmektedir.



Şekil 23. Kontrol (DBA/2J) grubu LD iskelet kası enine kesitinde A) gerçekleştirilen yapısal farklılıkları çözmeye yönelik kümeleme analizi sonucu elde edilen farklı bölgeleri gösteren harita, B) bu haritadaki farklı bölgelerden çıkarılmış olan spektrumlar. Yeşil spektrum A'da tespit edilen yeşil bölgeden, kırmızı spektrum ise kırmızı bölgeden çıkarılmıştır.

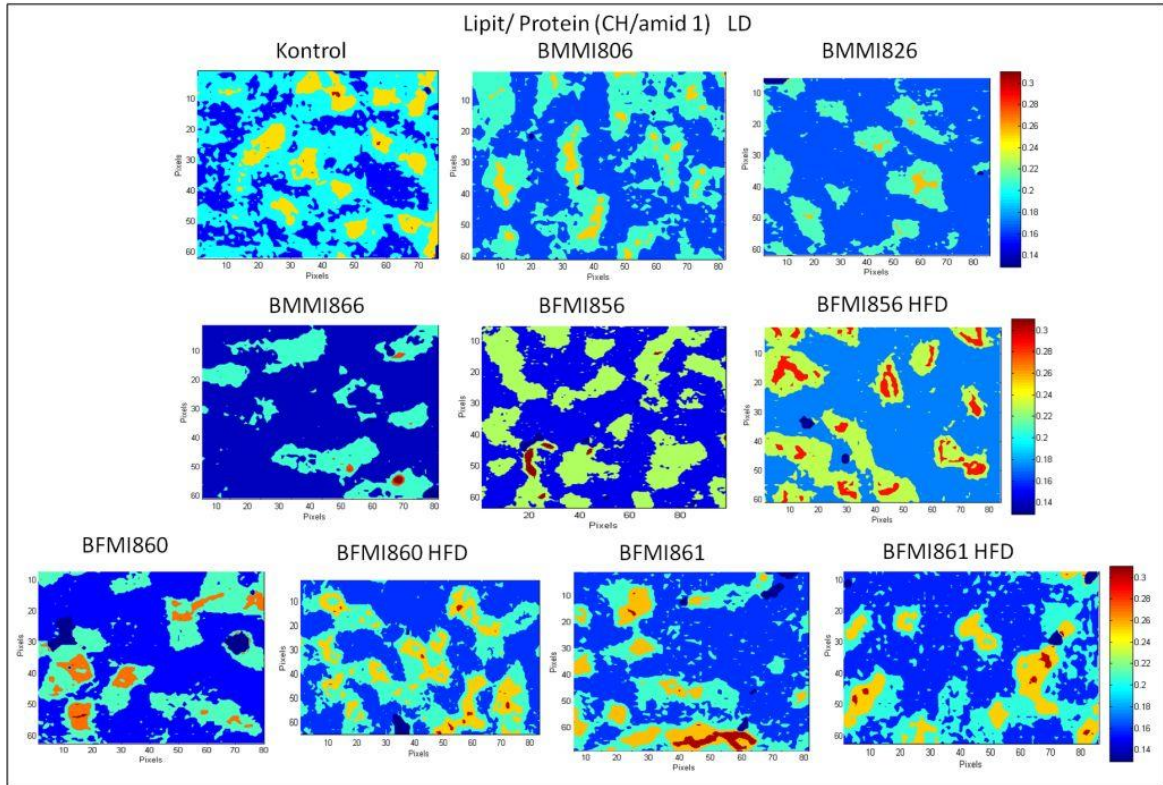


Şekil 24. Kontrol (DBA/2J) grubu A) LD kası, B) Q kası enine kesitlerinden FTIR mikrospektroskopisi ile toplanan spektral haritalardan hesaplanan lipit/protein (CH/amid 1), lipit içeriğindeki metilen grubu dağılımı (CH₂ antisimetrik gerilim/CH), lipit içeriğindeki metil grubu dağılımı (CH₃ antisimetrik gerilim/CH), lipitlerin hidrokarbon zincir uzunluğu dağılımı (CH₂ antisimetrik gerilim/CH₃ antisimetrik gerilim), lipitlerdeki karbonil grubu dağılımı (C=O simetrik gerilim/CH), doymamış/doymuş lipitlerin dağılımı (olefinik/CH₂ antisimetrik gerilim) ve kesitlerdeki glikojen (glikojen/1240 cm⁻¹) dağılımlarının örnek görüntüleri. Şekillerde kırmızı daire ile belirlenmiş kas lifinde bu alan oranlarının değişimi izlenebilmektedir.

Şekildeki kırmızı daire ile işaretlenmiş kas lifine bakıldığında, yüksek lipit/protein alan oranına sahip olan lifin lipit yapıları içerisinde daha yüksek miktarda metilen (CH₂) grubuna, düşük miktarda metil grubuna (CH₃), yüksek miktarda karbonil grubuna (C=O) sahip olduğu; daha uzun zincirli lipit yapıları barındırdığı, daha yüksek doymamışlık indeksine sahip olduğu ve daha düşük glikojen içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca ATR-FTIR spektroskopisi çalışmalarında da gözlemlendiği gibi LD kasında Q kasına nazaran daha belirgin farklılıkların gözlemlendiği de tespit edilmiştir. Bu nedenle,

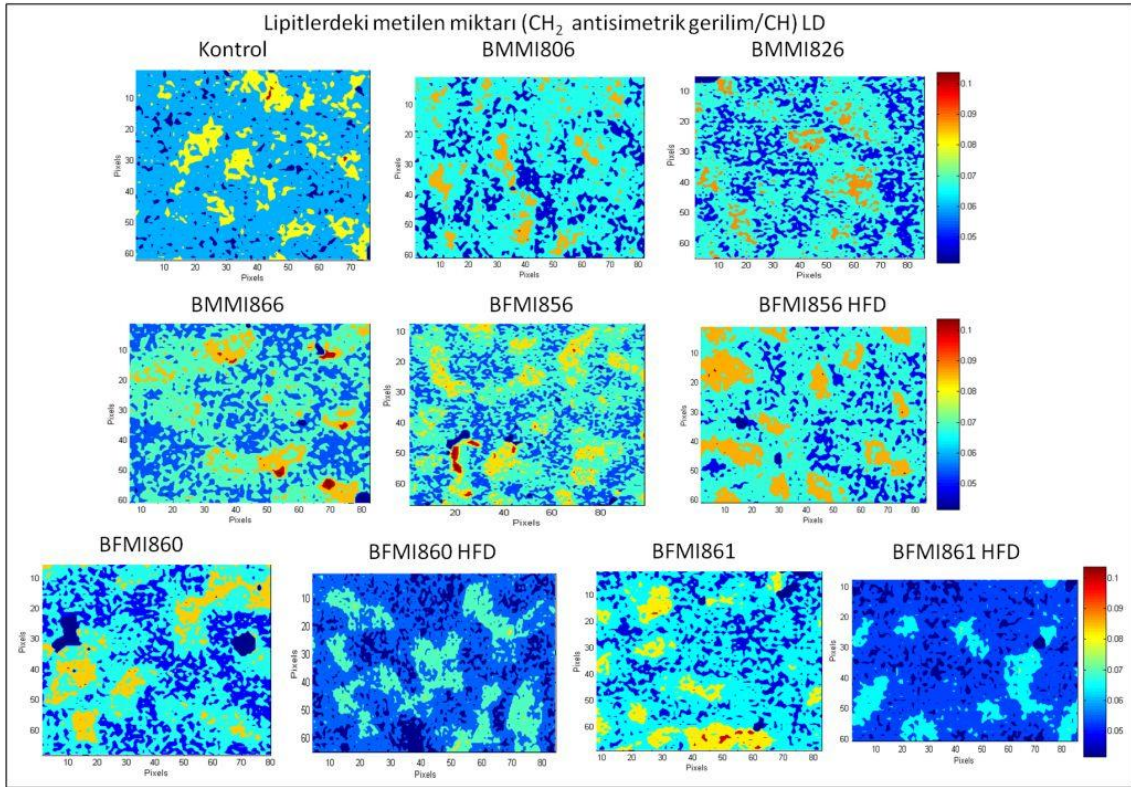
çalışmamızda incelenen kontrol, BMMI ve BFMI ırklarına ait spektral haritalarda hesaplanan bant alan oranı değişimlerinin karşılaştırılması daha fazla belirgin farklar gözlenmiş olan LD kaslarında rapor edilmiştir. Diğer gruba ait şekiller (Q kası) raporun sonunda ekler bölümünde sunulmuştur.

Şekil 25'te SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kas kesitlerinde CH toplam alanının amid I bant alanına oranlanması ile elde edilen lipit/protein spektral parametresinin dağılımı görülmektedir. Şekilden görülebileceği üzere, bu oran HFD ile beslenmiş BFMI856 ırkında daha yüksek olarak, BMMI866 ırkında ise en düşük olarak tespit edilmiştir. BFMI860 ve BFMI861 ırklarında ise bu oran ATR-FTIR spektroskopik çalışmalarda da tespit edildiği gibi kontrole yakın seviyede bulunmuştur. Bu sonuçlar FTIR-ATR sonuçlarımızla uyum içindedir. Daha önce belirtildiği gibi BFMI860 ve BFMI861 ırklarında hem lipit hem protein içeriği en yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu ırklarda lipit/protein oranında gözlenen azalma protein artımının lipit miktarındaki artıma nazaran daha fazla olduğundan kaynaklanabilir.

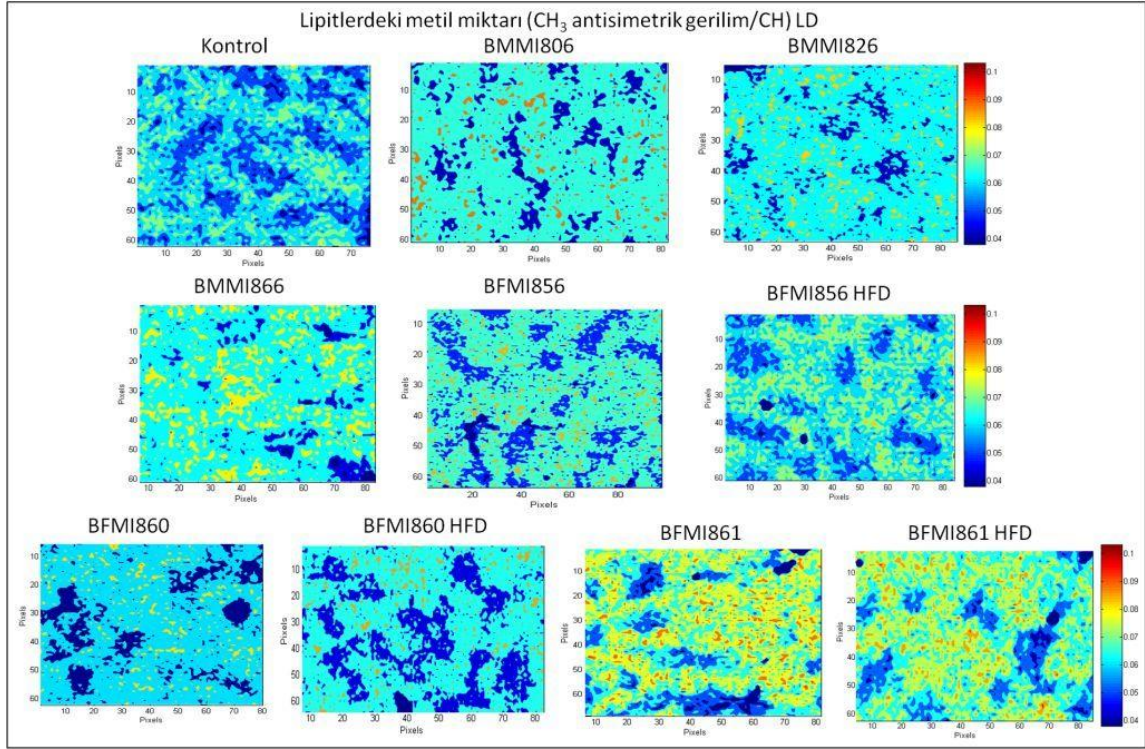


Şekil 25. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki lipit/protein değerinin değişimlerini gösteren örnek haritalar

Şekil 26’da SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kas kesitlerinde CH_2 antisimetrik bant alanının toplam CH bölgesi alanına oranlanması (CH_2/CH) ile elde edilen lipid içeriğindeki metilen grubu dağılımı, Şekil 27’de ise CH_3 antisimetrik bant alanının toplam CH bölgesi alanına oranlanması (CH_3/CH) ile elde edilen lipid içeriğindeki metil grubu dağılımı görülmektedir. Şekillerde de görülebileceği gibi tüm lipidler içerisindeki metilen grubu yoğunluğu LD kasında HFD ile beslenmiş BFMI860 ve BFMI861 ırklarında en düşük olarak, BFMI856 ırkında ise en yüksek olarak kaydedilmiştir. Metil grubu yoğunluğu ise SBD ve HFD ile beslenmiş BFMI861 ırkında en yüksek olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlarda ATR-FTIR spektroskopisi sonuçları ile uyum içindedir.

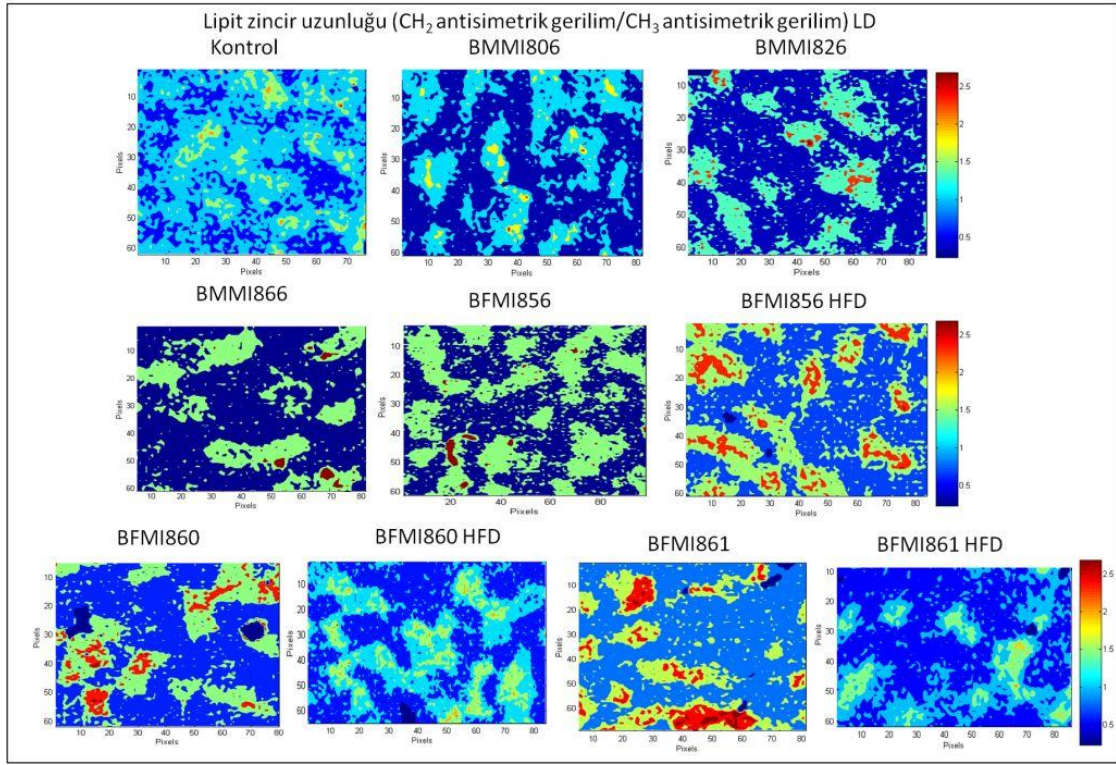


Şekil 26. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki CH_2 antisimetrik gerilim bant alanı/CH toplam alanı değerinin değişimlerini gösteren örnek haritalar.



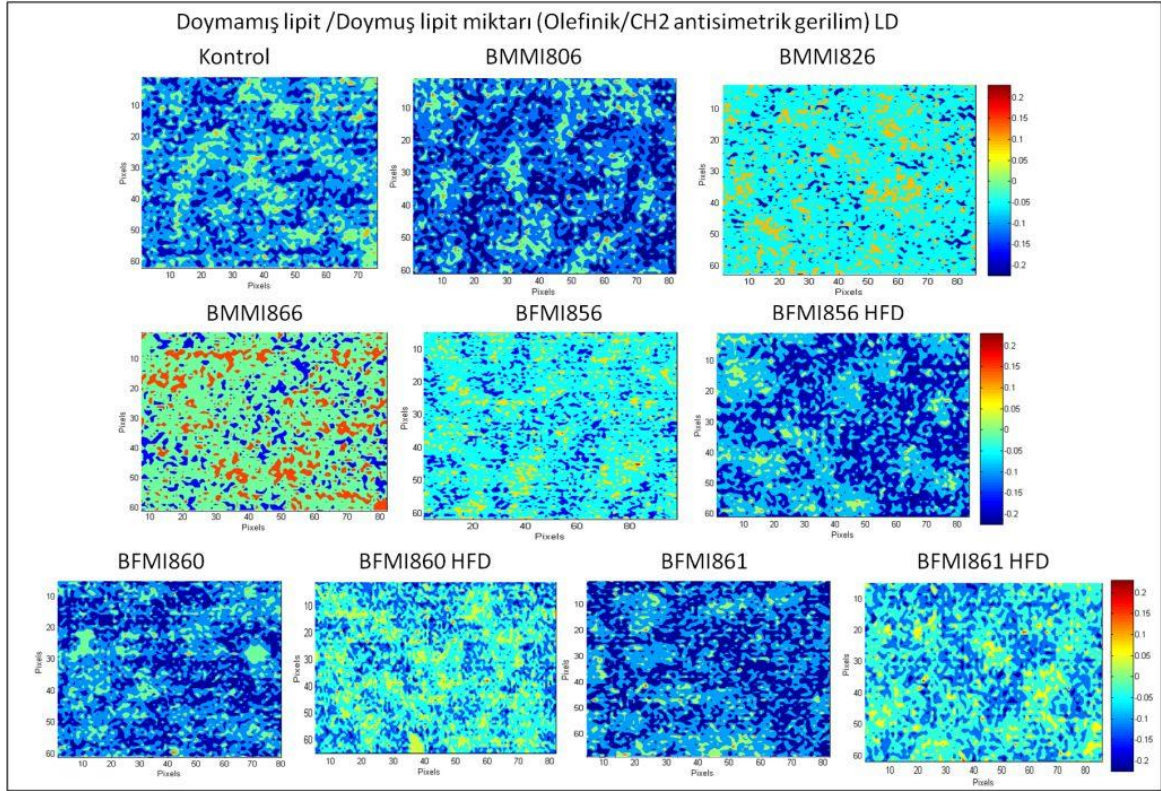
Şekil 27. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki CH_3 antisimetrik gerilim bant alanı/CH toplam alanı değerinin değişimlerini gösteren örnek haritalar.

Şekil 28’de SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kas kesitlerinde lipit yapılarındaki hidrokarbon zincir uzunluğunun dağılımı hakkında bilgi veren CH_2 antisimetrik bant alanının CH_3 antisimetrik bant alanına oranının dağılımı görülmektedir. Şekilden de görüldüğü üzere bu oran LD kasında BFMI860 ve BFMI861 ırklarında, BMMI ırklarından ise BMMI826 ve BMMI866 ırklarında BMMI806’ya nazaran yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu oranın yüksek olması bu ırklarda daha uzun hidrokarbon zincirli lipitlerin yer aldığını göstermektedir. HFD ile beslenmiş BFMI860 ve BFMI861 ırklarında ise bu oran düşük bir seviyede gözlenmiştir. Bu sonuç, BMMI806 ırkı ve HFD ile beslenmiş BFMI860 ve BFMI861 ırklarında daha kısa hidrokarbon zincirli lipitler bulunduğunu göstermektedir.



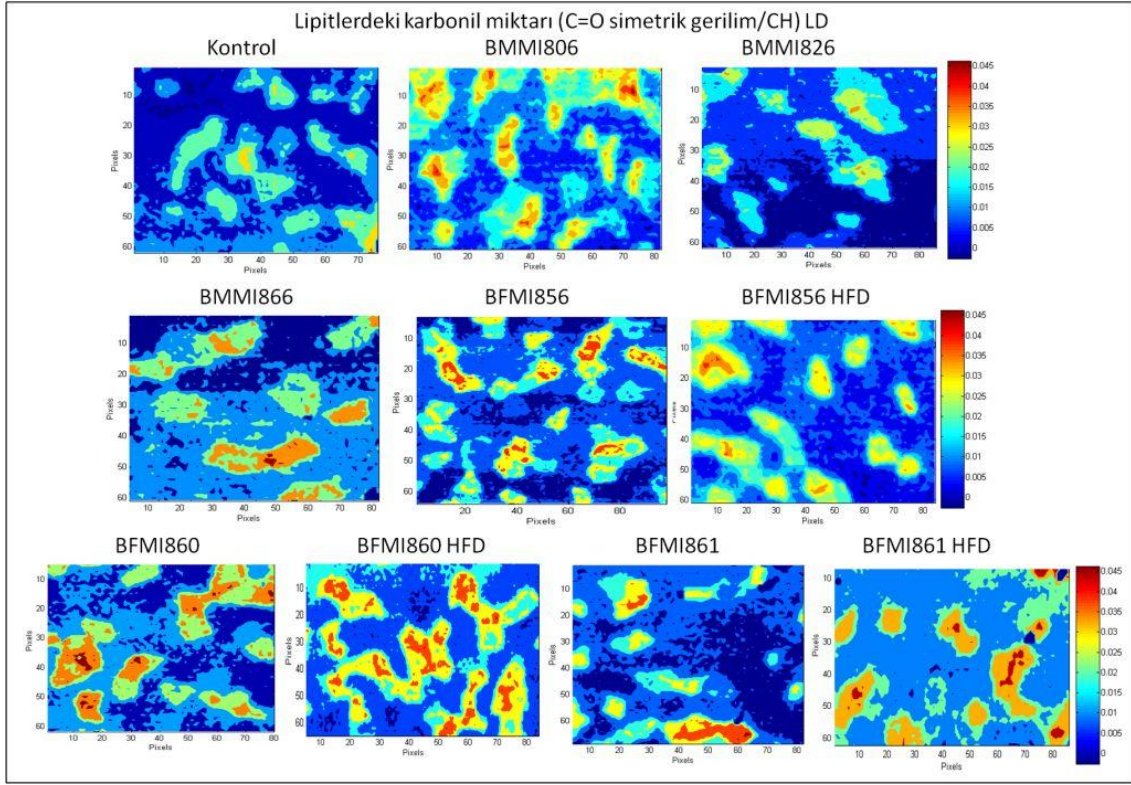
Şekil 28. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki CH_2 antisimetrik gerilim bant alanı/ CH_3 antisimetrik gerilim bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.

Şekil 29’da SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kas kesitlerinde olefinik bant alanının CH_2 antisimetrik bant alanına oranlanması ile elde edilen ve doymamış lipid içeriği indeksi olarak kullanılacak parametrenin dağılımı görülmektedir. Şekilden de görülebileceği gibi, BFMI ırkları arasında LD kasında en yüksek doymamış lipid indeksine sahip olan BFMI856 ırkıdır, BFMI860 ve BFMI861 ırkları ise en düşük indeks değerine sahiptirler. BMMI ırklarında bu oran BMMI806 ırkında en düşük değerde olup BMMI866 ırkında ise en yüksek doymamışlık indeksi gözlenmiştir. HFD ile beslenmiş BFMI ırklarında bu indeks değeri özellikle BFMI856 ırkında düşüş gösterirken BFMI860 ve 861 ırklarında artmıştır. Bunun nedeni HFD ile beslenmede doku içerisine diğer lipid çeşitlerinde görülen artımla paralel olarak daha fazla doymamış lipid alınması olabilir.



Şekil 29. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMi ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMi ırkları LD kası enine kesitlerindeki olefinik bant alanı/ CH₂ antisimetrik bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.

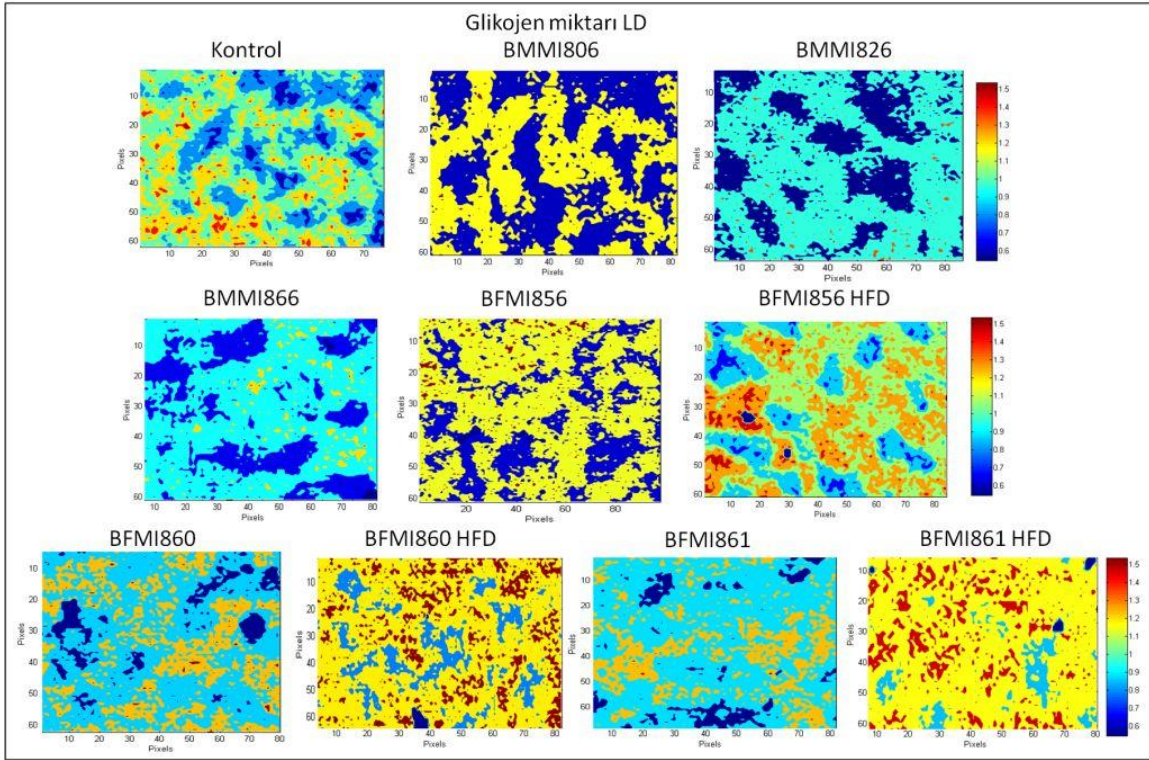
Şekil 30’da SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMi ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMi ırkları LD kas kesitlerinde C=O ester gerilim bant alanınının CH toplam alanına oranlanması ile elde edilen ve trigliserit, kolesterol ester miktarının görüntülenmesini sağlayan spektral parametre değerinin dağılımı görülmektedir. Şekilden de görüleceği üzere LD kasında da trigliserit ve kolesterol ester miktarı BFMi ırklarında BMMI ırklarına nazaran daha yüksektir. HFD ile beslenmiş BFMi ırklarında ise trigliserit ve kolesterol miktarı daha da fazla olarak gözlenmiştir. BMMI ırkları içerisinde ise BMMI806 ırkında trigliserit ve kolesterol ester içeriğinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 30. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki C=O ester bant alanı/ CH toplam alanı oranı değişimlerini gösteren örnek haritalar.

Şekil 31’de SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kas kesitlerinde glikojenden kaynaklanan ve 1047 cm^{-1} ’de yer alan bant alanının proteoglikanların sülfat gerilim ve kolajenin amid III titreşimlerinden kaynaklanan ve ATR-FTIR spektroskopisi çalışmasında gruplar arası anlamlı bir değişim göstermeyen 1240 cm^{-1} ’de yer alan bant alanına oranlanması ile elde edilen parametre değerinin dağılımı görülmektedir. Bu dağılım haritalarından da görüldüğü üzere tüm BFMI ırklarında, özellikle de HFD ile beslenmiş gruplarda bu oranın BMMI ırklarına göre daha yüksek değerlerde olduğu görülmüştür.

Görüldüğü gibi, LD kasında FTIR mikrospektroskopik görüntüleme çalışmaları ile elde edilen bu sonuçlar ATR-FTIR spektroskopik metodu ile elde edilen sonuçları desteklemektedir. Q kasında da yine ATR-FTIR spektroskopik metodu ile tespit edilen değişimler görüntülenmiştir. Kas lifi tipi farkına göre farklı özellikte lipidlerin iskelet kaslarında depolandığı gözlenmiş, özellikle lipid/protein oranı yüksek kas liflerinde lipidler içerisindeki metilen, metil ve karbonil içeriğinin yüksek olduğu, bu liflerin daha yüksek miktarlarda trigliserit içerdiği, ayrıca glikojen oranlarının düşük olduğu gözlenmiştir.



Şekil 31. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları LD kası enine kesitlerindeki glikojen bant alanı/ 1240 cm^{-1} bant alanı değerinin değişimlerini gösteren örnek haritalar.

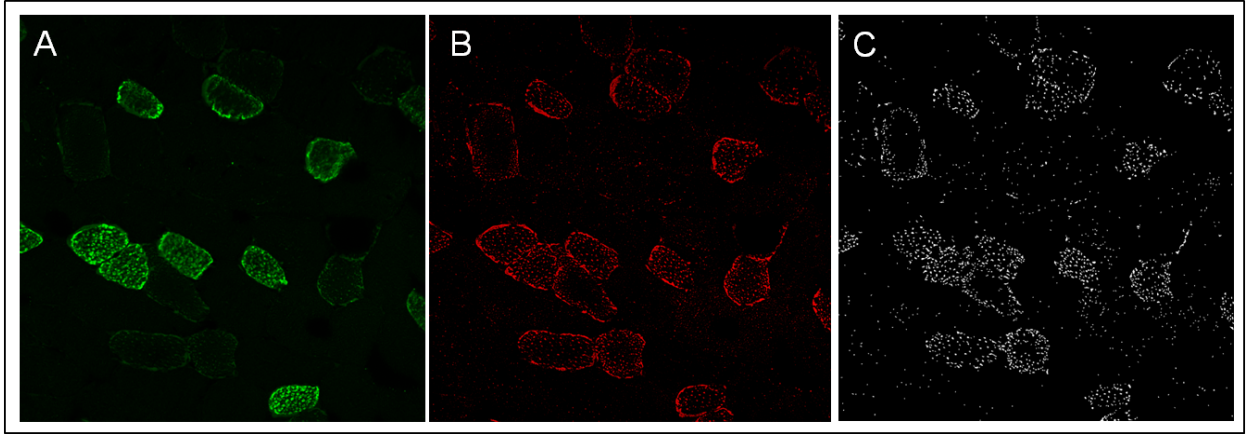
4.3.2. Konfokal mikroskopisi çalışmaları

FTIR mikroskopisi çalışmaları ile elde edilen ve yukarıda bahsedilen iskelet kası içindeki lipid dağılım sonuçlarını desteklemek ve farklı kas liflerinde depolanan lipid miktarlarını daha kesin olarak belirlemek amacıyla konfokal mikroskopisi çalışmaları yapılmıştır. Dokularda depolanan lipid damlacıkları trigliserit ve diğer nötral lipid çeşitlerini depolayan organeller olarak tanımlanabilir. Hücrelerin içine girebilen ya da birbirleri ile birleşebilen bu dinamik organeller içerisindeki lipidler bazı proteinlerin de bağlantılı olduğu bir dizi fosfolipit tabakası ile çevrelenmiştir. Hücrelerde bu lipid damlacıklarını boyamak ve görüntülemek için damlacıkları saran bu proteinlerin işaretlenmesi üzerine pek çok değişik boyama metodu önerilmesine rağmen, bu damlacıkların en güvenilir biçimde görüntülenebilmesi için damlacığın içerisindeki lipid içeriğinin lipofilik bir boya ile boyanması gerekmektedir (WOLINS v.d., 2005). Projemiz

dahilinde, iskelet kas dokularında depolanan lipidlerin dağılımlarının görüntülenebilmesi için kullandığımız konfokal mikroskopisi çalışmalarında yeni geliştirilen bir nötral lipid boyası olan LD540 kullanılmıştır (SPANDL v.d., 2009).

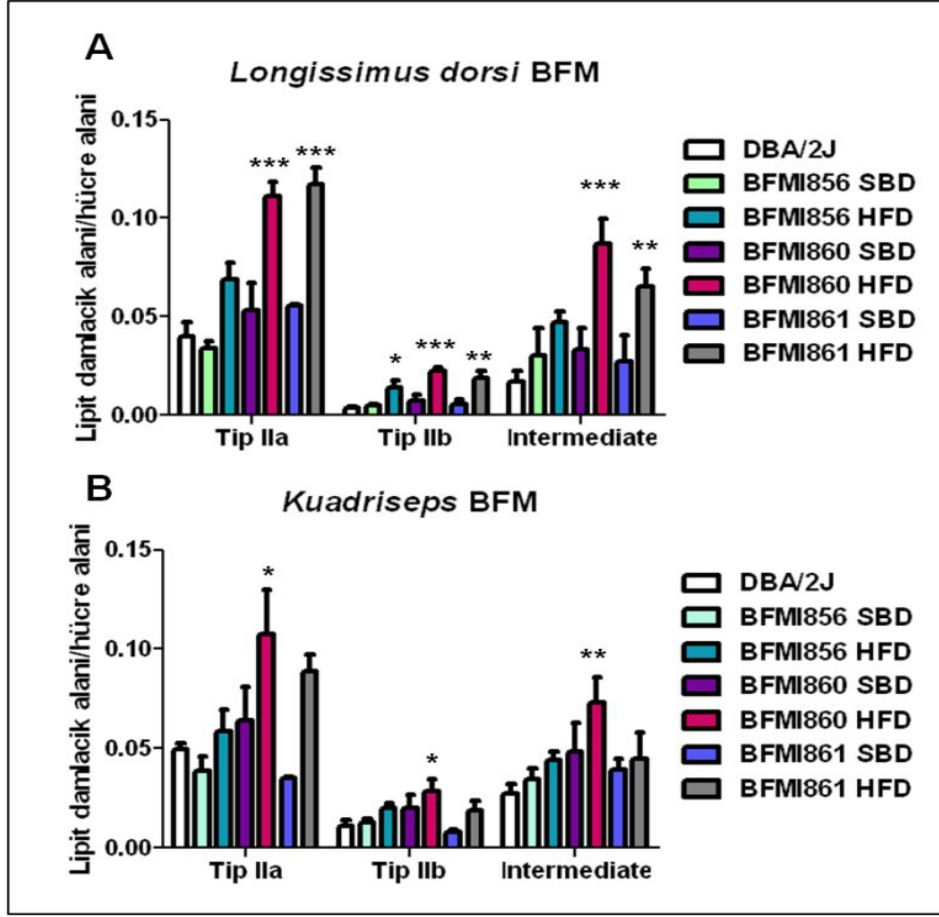
Yapılan ön çalışmalarda, iskelet kas dokularında bazı liflerde daha fazla lipid damlacıkları bulunduğu görülmüştür. Bu farklılığın, metabolizma faaliyetleri farklı olan yavaş ve hızlı kasılan kas liflerinde farklı miktarlarda lipid depolanmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. İncelenecek olan kontrol, BMM ve BFM ırkları iskelet kaslarında hangi kas lifi tipinde daha fazla lipid depolandığını belirleyebilmek için iki farklı seri kesitten birinin lipid boyası ile diğerinin ise kas lifi tipi antiadileri ile boyanmasına karar verilmiştir. Yavaş kasılan (tip I) ve oksidatif özelliklere de sahip olmasına karşın hızlı kasılan (tip IIa) kas lifi tiplerine MHC antiadileri kullanılarak kesitler boyanmış ve kas lifi tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kaslardan ikişer seri kesit alınmıştır. Kesitlerden biri lipid içeriğinin görüntülenebilmesi için LD540 boyası ile, diğeri ise kas lifi tipinin belirlenmesi amacıyla MHC antiadileri ile boyanmıştır. Böylece, bu iki kesit eş zamanlı incelenerek ve karşılaştırılarak lipid boyası ile boyanan kesitten lipid içeriğini hesaplamak için görüntü alınan her bölge, kas tipi lifi boyaması yapılmış olan kesitte tespit edilmiş, böylelikle hangi kas tipi lifinde ne kadar lipid içeriği olduğu hesaplanmıştır. Yapılan incelemelerde incelediğimiz kaslarda (LD ve Q) az sayıda tip I kas lifine ratlanmıştır, bu nedenle tip I kas liflerinden elde edilen ölçümler yanlış bir sonuca varmamak amacıyla rapor edilmemektedir. Buna karşılık incelenen her kesitte makul ölçüde gözlenen tip IIa, tip IIb kas lifleri ile tip IIa ile tip IIb arası boyanma özelliği gösteren ara tip (intermediate) kas liflerinden elde edilen ölçüm sonuçları rapor edilmektedir.

Şekil 32'de bir kontrol longissimus dorsi iskelet kası kesitinin 488nm dalga boyundaki Argon lazer ile illimüne edilmesi ile elde edilen ve tip IIa kas liflerini yeşil renkte gösteren (Şekil 32A), 543 nm dalga boyundaki Helyum-Neon lazer ile illümüne edilmesi ile elde edilen ve lipid damlacıklarını kırmızı renkte gösteren (Şekil 32B) konfokal mikroskopisi görüntüleri verilmiştir. Tespit edilen bu damlacıkların özel analiz programı ile ayrıştırıldıktan sonraki görüntüleri ise Şekil 32C'de görülmektedir.



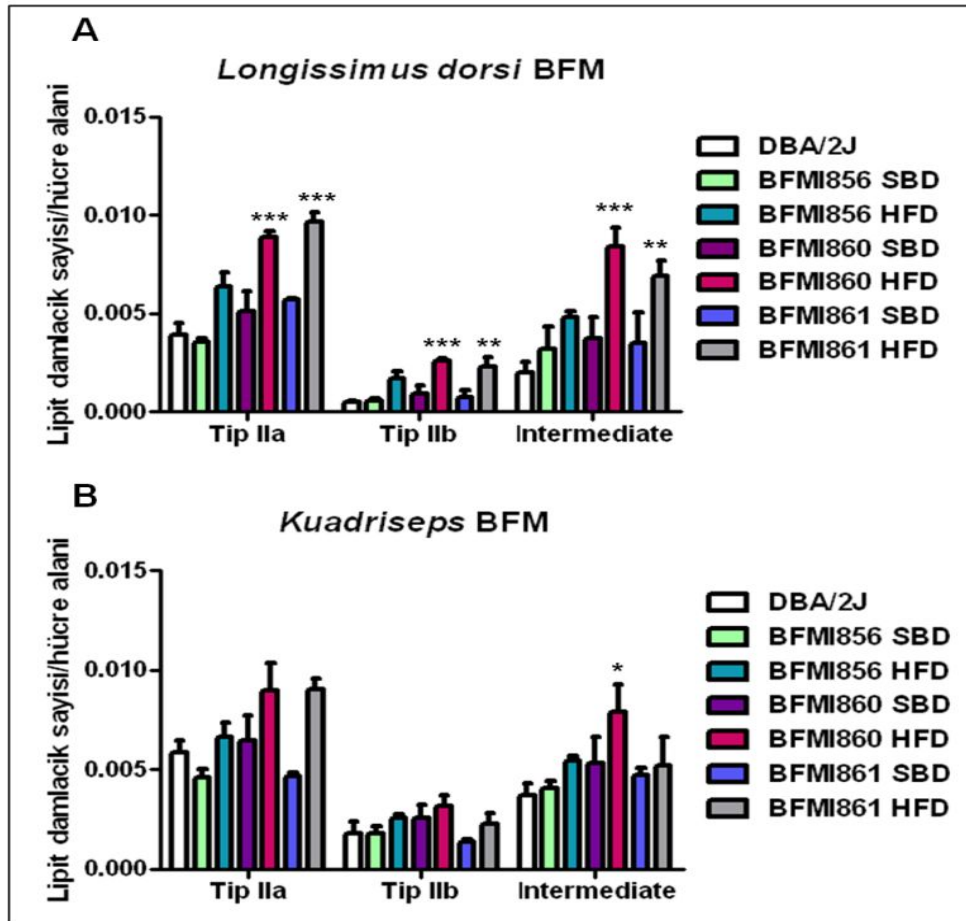
Şekil 32. 6 mikron kalınlığındaki kontrol (DBA/2J) LD iskelet kas dokusu enine kesitlerinin LD540 boyası ve tip IIa kas liflerini boyayan MHC IIa antibadisi ile boyamasından sonra A) 488 nm dalga boyunda Argon lazerle (tip IIa kas lifleri görülmektedir), B) 543 nm dalga boyunda Helyum-Neon lazerle (lipit damlacıkları görülmektedir) illümine edilmesi sonucunda 40X'lik objektif kullanılarak elde edilen örnek konfokal mikroskopi görüntüleri ve C) 543 nm dalga boyunda toplanan görüntü içerisindeki boyanan lipit damlacıklarının özel analiz programı ile hesaplanmış örnek görüntüsü.

Şekilde de görüldüğü gibi yeşil renge boyanan kas lifleri tip IIa lifleridir. Daha hafif bir şekilde yeşile boyanan lifler ara tip lif olarak kabul edilmiştir ve bu liflerin içeriğindeki lipit miktarı da ayrı olarak hesaplanmıştır. Şekil 33 ve 34'de kontrol DBA/2J ve BFMI grupları için sırasıyla lipit damlacık alanının kas lifi alanına oranlanması ile ve lipit damlacık sayısının kas lifi alanına oranlanması ile elde edilen analiz sonuçları gösterilmektedir. Yapılan hesaplamalar yanıltıcı bir sonuca varmamak amacıyla lipit damlacık sayısının ve alanının incelenen toplam kas lifi alanına oranlanması şeklinde gösterilmektedir.



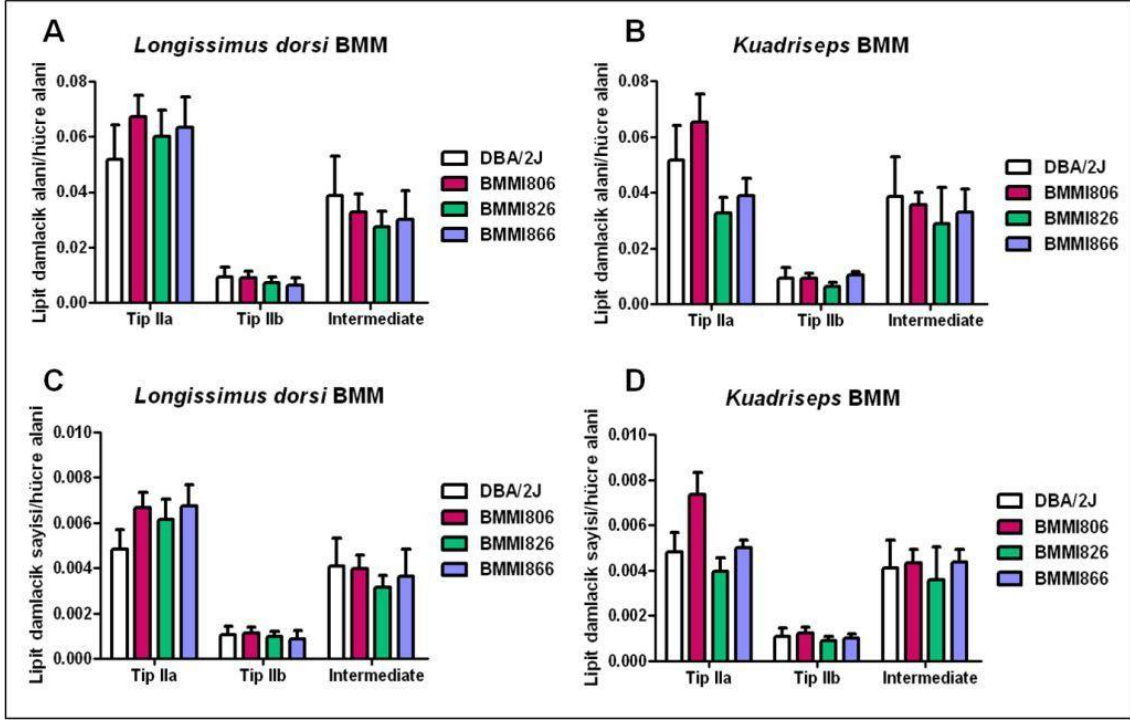
Şekil 33. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), SBD veya HFD ile beslenmiş BFMI fareleri A) longissimus dorsi ve B) kuadriseps iskelet kası kesitlerinden elde edilen tip IIa, IIb ve ara tip (intermediate) kas liflerine ait lipit damlacıkları toplam alanının hesaplama yapılan toplam kas lifi alanına bölünmesi ile elde edilen lipit dağılım grafikleri.

Şekillerden de görüldüğü gibi, her iki kasta da daha oksidatif bir metabolizmaya sahip olan tip IIa kas liflerinde daha yüksek miktarda nötral lipit depolanmıştır. Tip IIa liflerinin yanı sıra, tip IIa ile IIb arası metabolizmal özellik gösteren ara tip (intermediate) kas liflerinde de belirgin lipit depolanması tespit edilmiştir. Depolanan nötral lipit damlacıklarının toplam alanlarının incelenen kas lifi toplam alanına oranına bakıldığında, her iki kasta da tip IIa kas liflerinde hem BFMI860 hem BFMI861 ırklarında daha fazla lipit depolandığı ve HFD ile beslenmiş gruplarda daha muazzam bir depolanma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 33A). Fakat LD kasının tip IIb ve ara tip (intermediate) kas liflerinde ve Q kasının tüm kas lifi tiplerinde BFMI860 ırkında daha fazla lipit depolanması gerçekleştiği görülmüştür. Benzer sonuçlar lipit damlacık sayısının incelenen toplam kas lifi alanına oranlanması ile elde edilen hesaplamalarda da gözlenmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), SBD veya HFD ile beslenmiş BFMI fareleri A) longissimus dorsi ve B) kuadriseps iskelet kası kesitlerinden elde edilen tip IIa, IIb ve ara tip (intermediate) kas liflerine ait lipit damlacıkları toplam sayısının hesaplama yapılan toplam kas lifi alanına bölünmesi ile elde edilen lipit dağılım grafikleri.

Şekil 35'te kontrol DBA/2J ve BMMI grupları iskelet kas kesitlerinde hesaplanan lipit damlacık alanının toplam kas lifi alanına oranlanması (Şekil 35A, B) ve lipit damlacık sayısının toplam kas lifi alanına oranlanması (Şekil 35C, D) ile elde edilen analiz sonuçları gösterilmektedir. Şekilden görülebileceği gibi, BMMI ırklarında da benzer şekilde tip IIa kas lifleri ile IIa ve IIb arası özellik gösteren ara tip kas liflerinde daha yüksek miktarda lipit depolandığı gözlenmiştir. Fakat, BFMI ırkları ile elde edilen sonuçların aksine gruplar arası anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Tüm kas lifi tiplerinde, BMMI ırkları içerisinde en fazla lipit damlacığı depolamaya yatkın ırk BMMI806 olarak gözlenmiştir.



Şekil 35. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J) ve BMMI fareleri LD (A,C) ve Q (B, D) iskelet kasları tip IIa, IIb ve ara tip (intermediate) kas liflerine ait iskelet kası kesitlerinden elde edilen lipit damlacıklarının toplam alanının hesaplama yapılan toplam kas lifi alanına bölünmesi ile (A, B) ve lipit damlacıklarının toplam sayısının hesaplama yapılan toplam kas lifi alanına bölünmesi ile (C,D) elde edilen lipit dağılım grafikleri.

Kullandığımız LD540 boyası nötral lipitleri boyamak için kullanılan bir boyadır (SPANDL v.d., 2009). Lipit damlacıkları şeklinde dokularda depolanan nötral lipitler içerisinde en yaygın olarak gözlenen lipit çeşidi ve lipit damlacıklarının temel depo maddesi trigliseritlerdir (SPANGENBURG v.d., 2011). Bu nedenle konfokal mikroskopisi ile elde ettiğimiz bu sonuçların temel olarak trigliserit dağılımını gösterdiği öngörülebilir. Bu nedenle konfokal mikroskopik çalışmamız ile SBD veya HFD ile beslenmiş tüm BFMI ırklarından BFMI860 ırkında ve BMMI ırklarından BMMI806 ırkında en yüksek miktarda lipit depolandığına dair elde ettiğimiz bu sonuç, ATR-FTIR spektroskopisi ve FTIR mikrospektroskopisi ile elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir.

5. HPLC-ELSD ÇALIŞMALARI

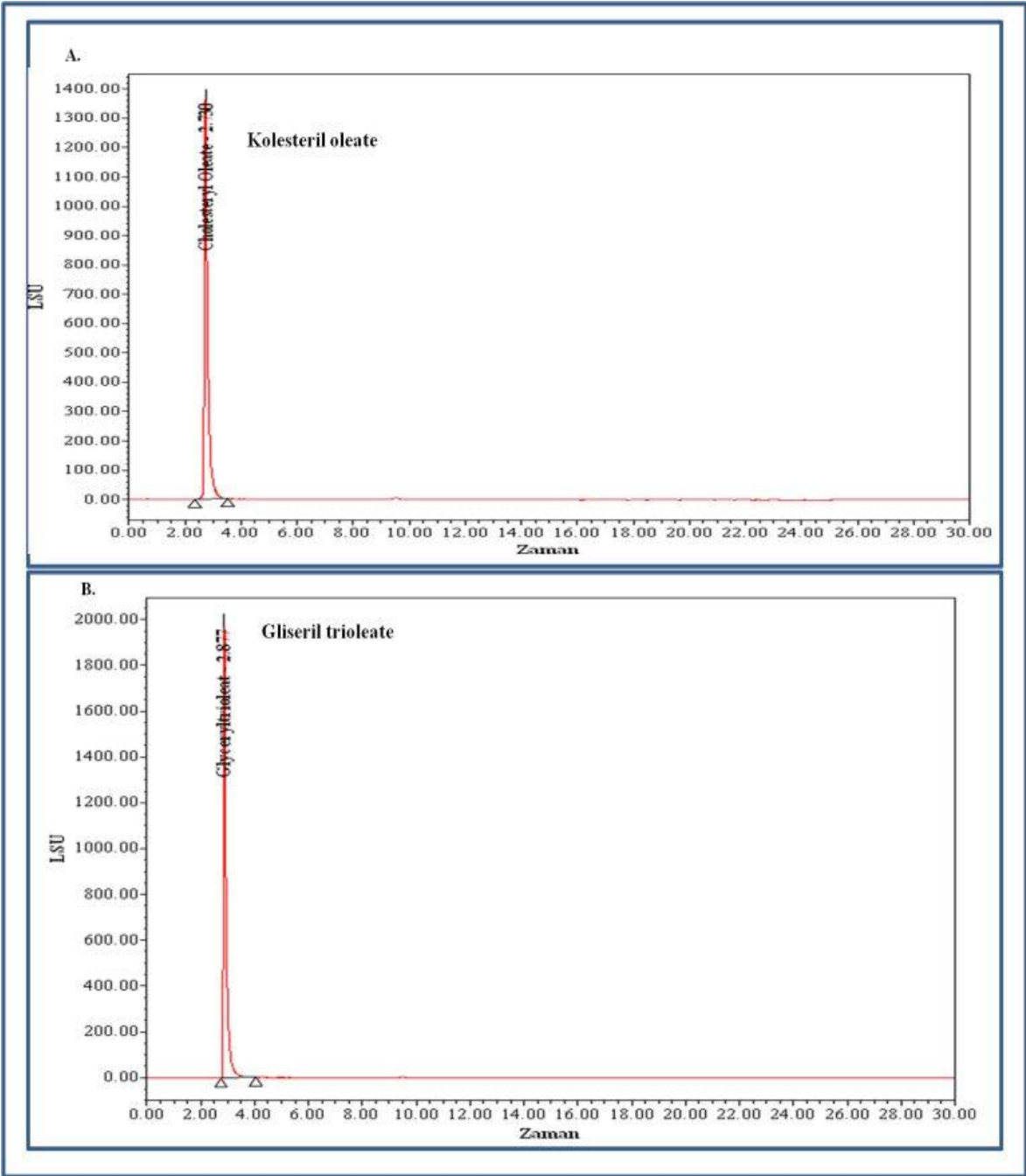
DBA/2J, C57BL/6J kontrol fare ırklarının, BFMI obez inbred fare ırklarının ve BMMI kas inbred fare ırklarının LD ve Q kas dokularından elde edilen lipitlerin nitel ve nicel tayinleri için ilk önce kolesteril oleat, gliseril trioleat, kolesterol, 1-oleil-rak-gliserol,

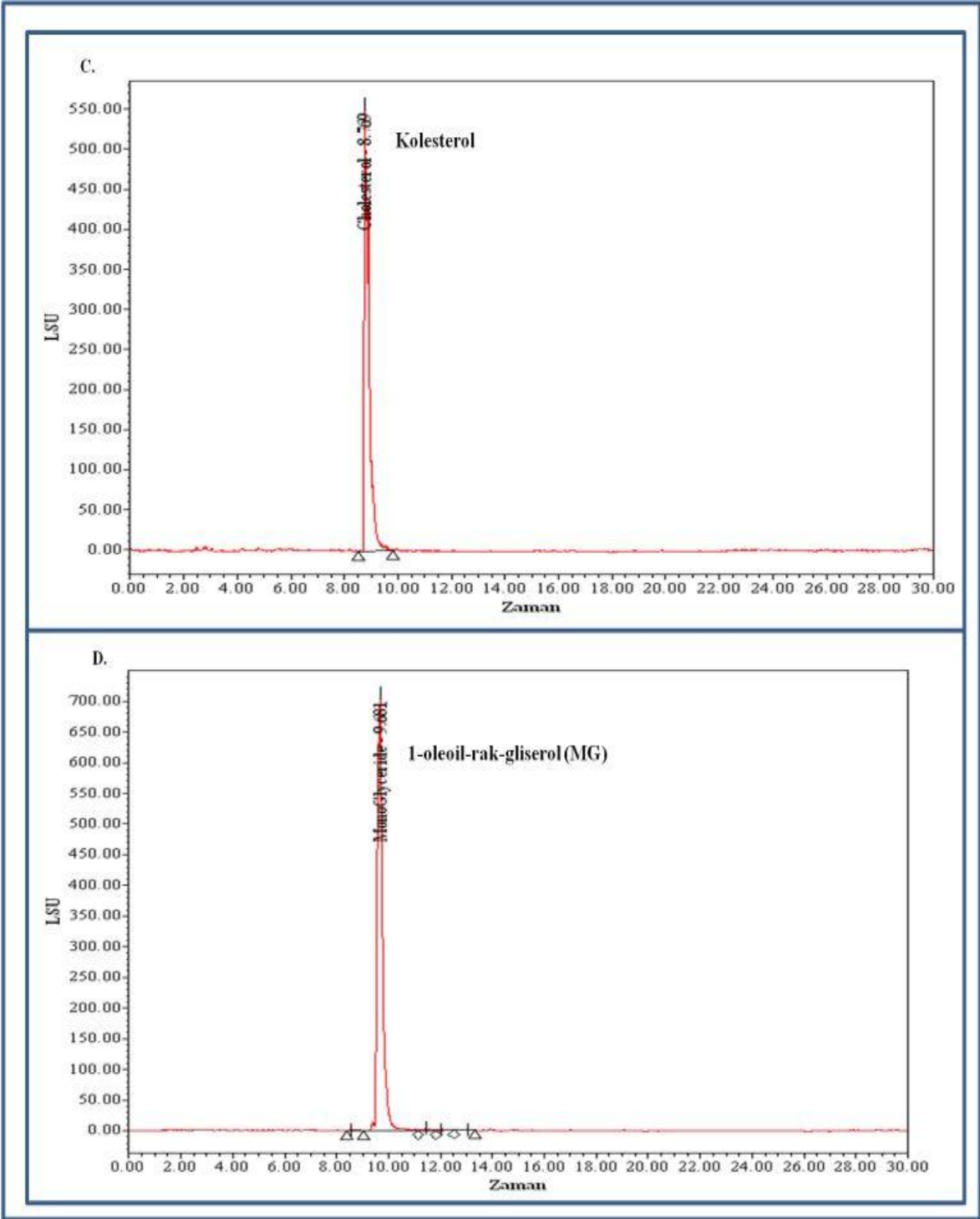
fosfatidilkolin ve kardiyolipin standartları farklı konsantrasyonlarda, Waters Alliance HPLC e2695 Separations Module enstrümanı ve Waters 2424 ELS dedektörü kullanılarak yürütülmüştür. Böylece, her bir standart lipitin kendisine özgü olan tutulma süreleri bulunmuştur (Şekil 36). Standart lipitlerin tutulma süreleri, kromatogramlarda görülme sırasına göre Tablo 13’ te belirtilmiştir.

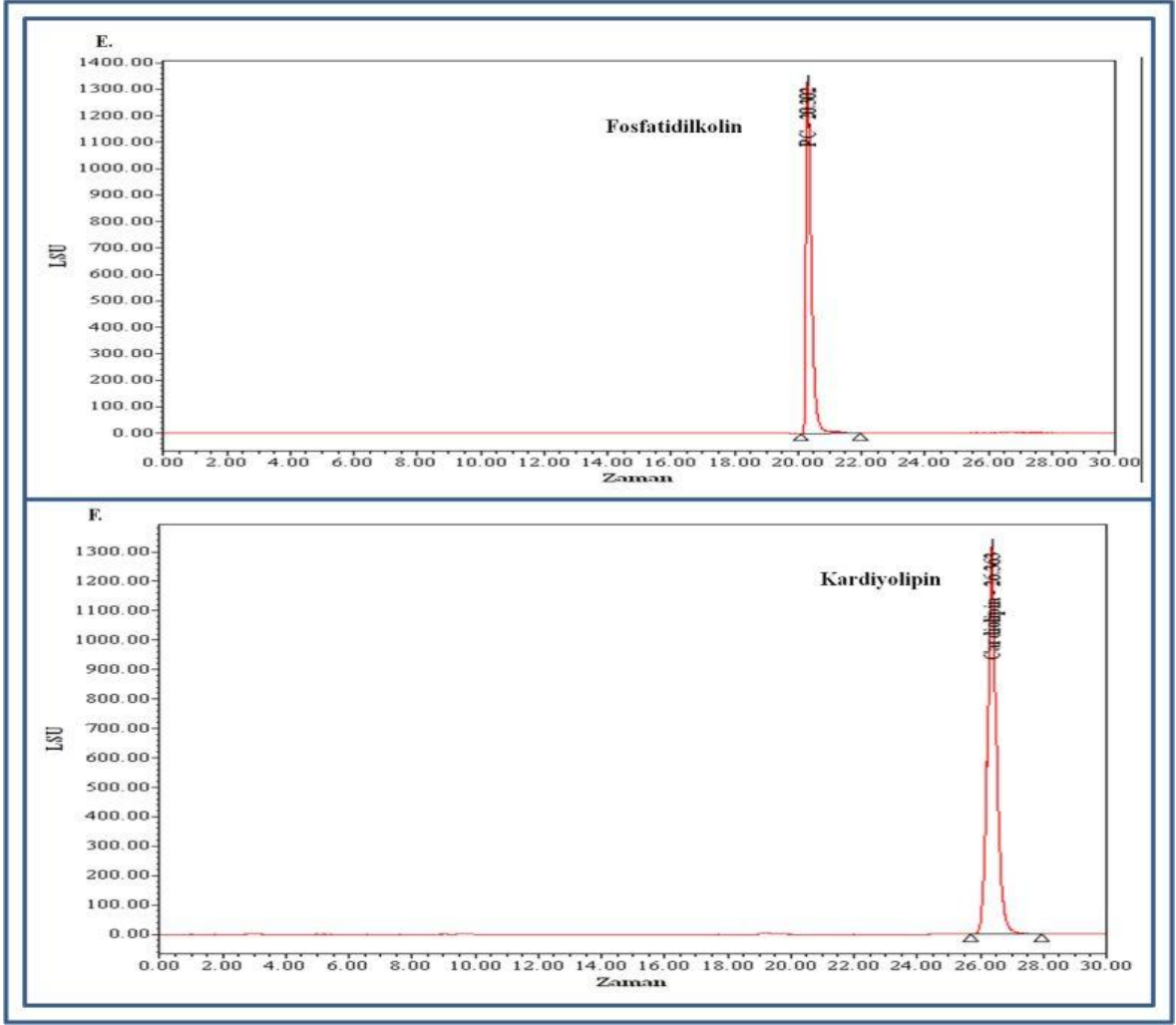
Tablo 13. HPLC-ELSD deneylerinde kullanılan standart lipitlerin tutulma süreleri.

Standart	CO	TG	C	MG	PC	CLPN
Tutulma Süresi (sn.)	2.734±0.011	2.872±0.031	8.761±0.034	9.681±0.027	20.302±0.802	26.360±0.876

Kontrol, BFMI ve BMMI inbred fare ırklarının LD ve Q kas dokularından elde edilen lipitlerin miktarını tayin edebilmek için, farklı konsantrasyonlarda yürütülen her bir standart için kalibrasyon eğrisi Waters Empower Pro adlı bilgisayar programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 37). Deneylerde kullanılan bütün standartların belirleme katsayısı (R^2), uygun sınır değer olan 0.99’ dan büyük çıkmıştır. Bu kalibrasyonun uyum iyiliğini göz önüne sermektedir.



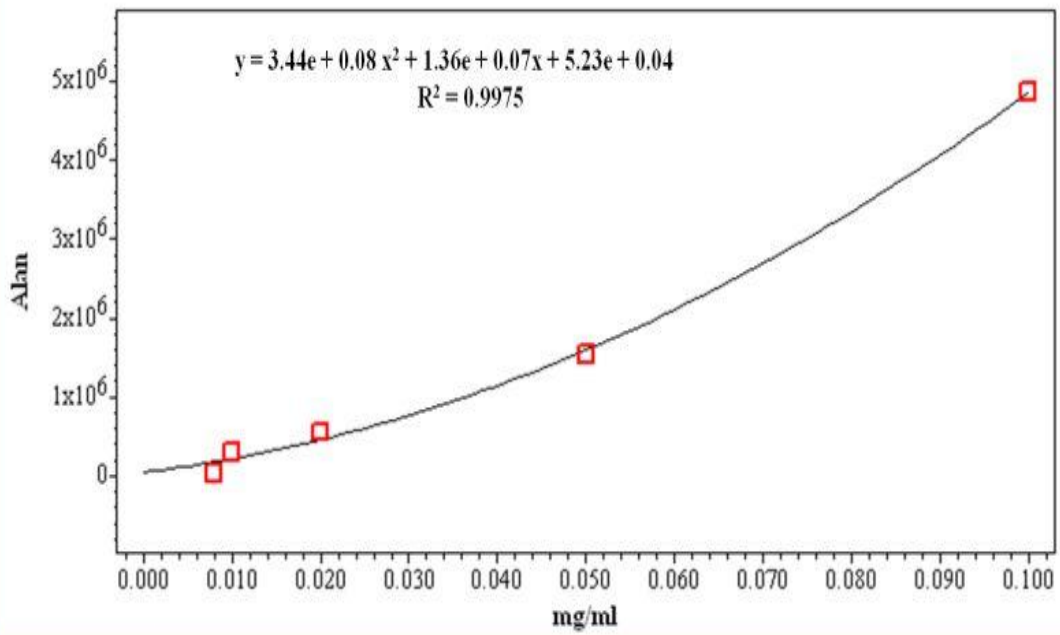




Şekil 36. Standart lipitlerin HPLC-ELSD kromatogram sonuçları. A) Kolesteril oleat (CO), B) Gliseril trioleat (TG), C) Kolesterol (C), D) 1-oleoil-rak-gliserol (MG), E) Kardiyolipin (CLPN), F) Fosfatidilkolin (PC).

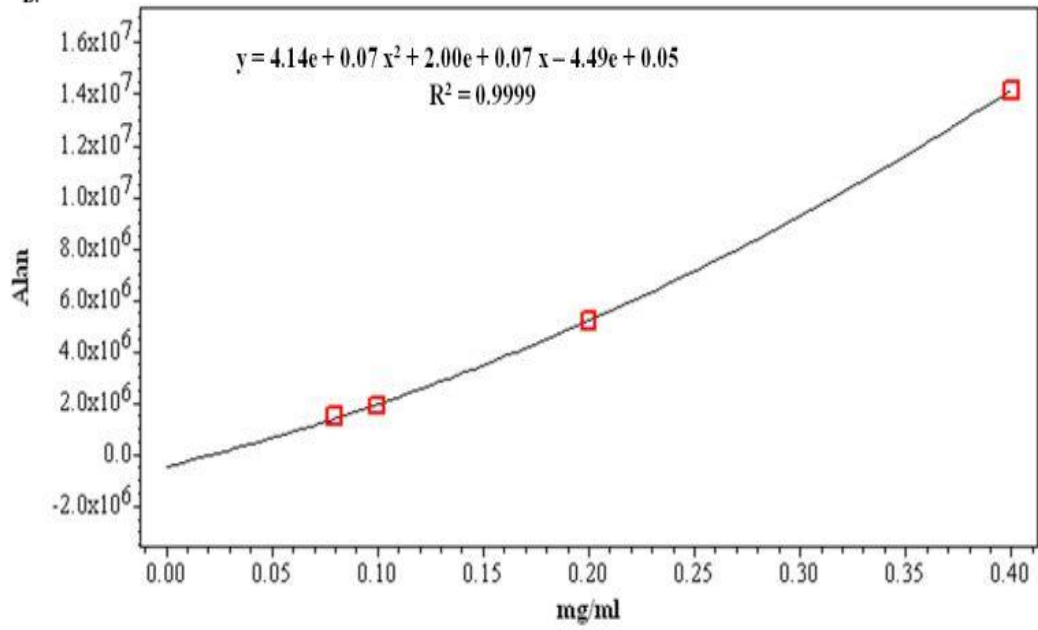
A.

CO



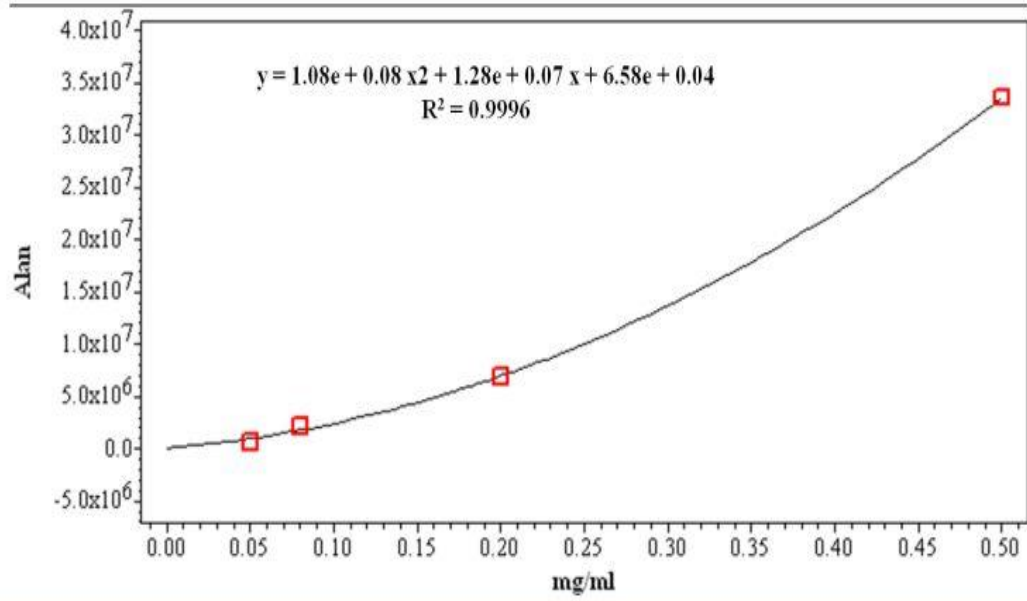
B.

TG



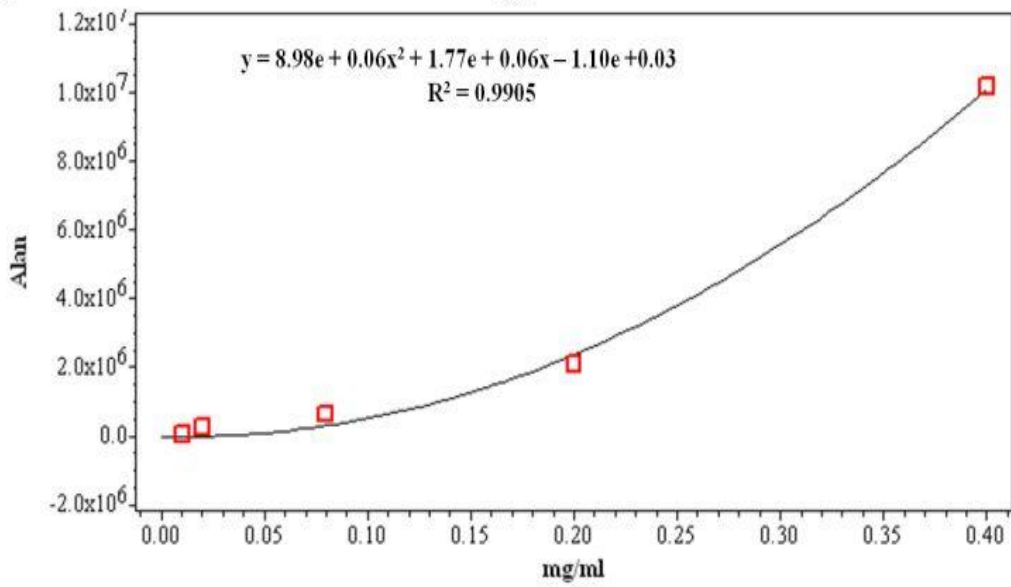
C.

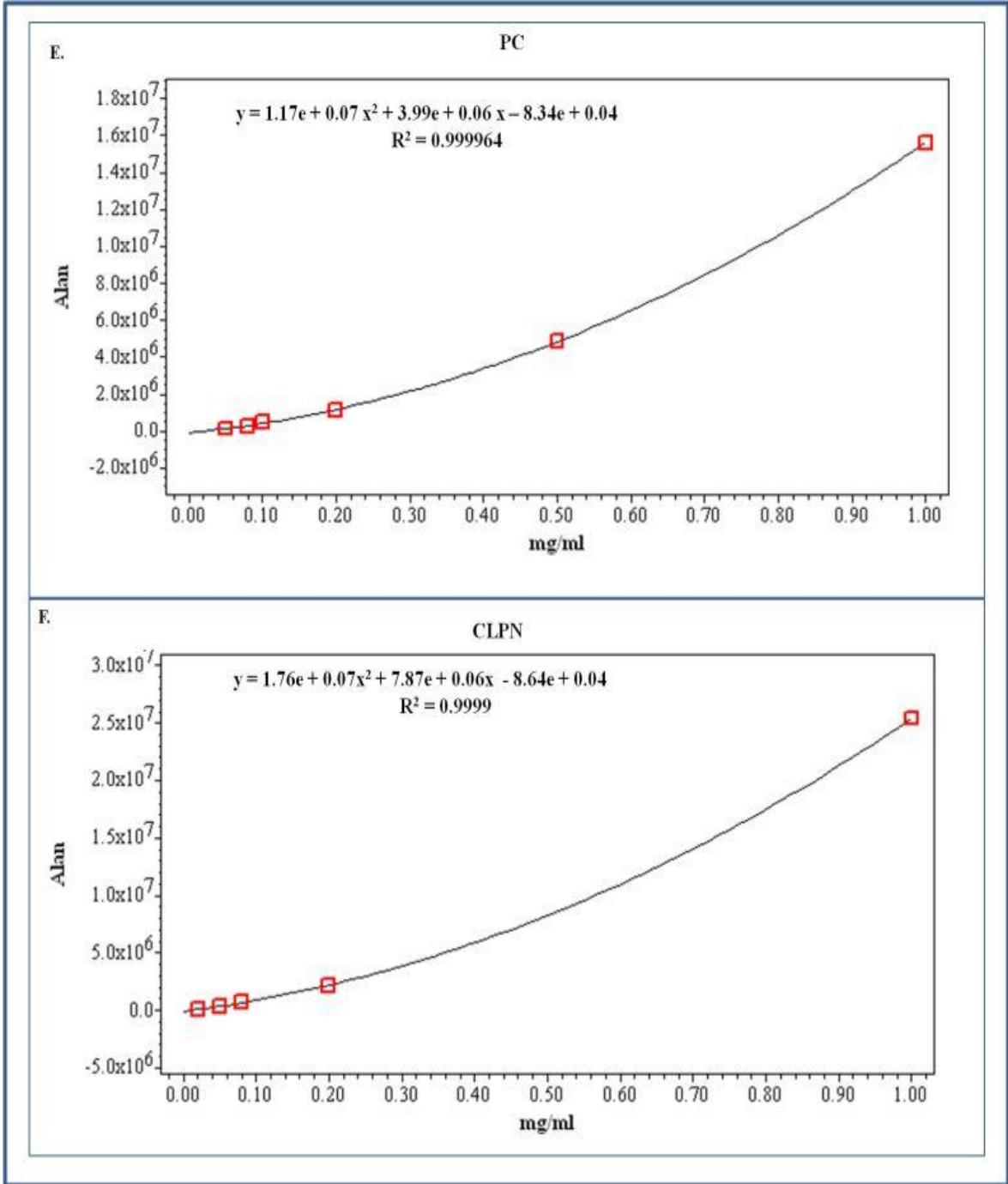
C



D.

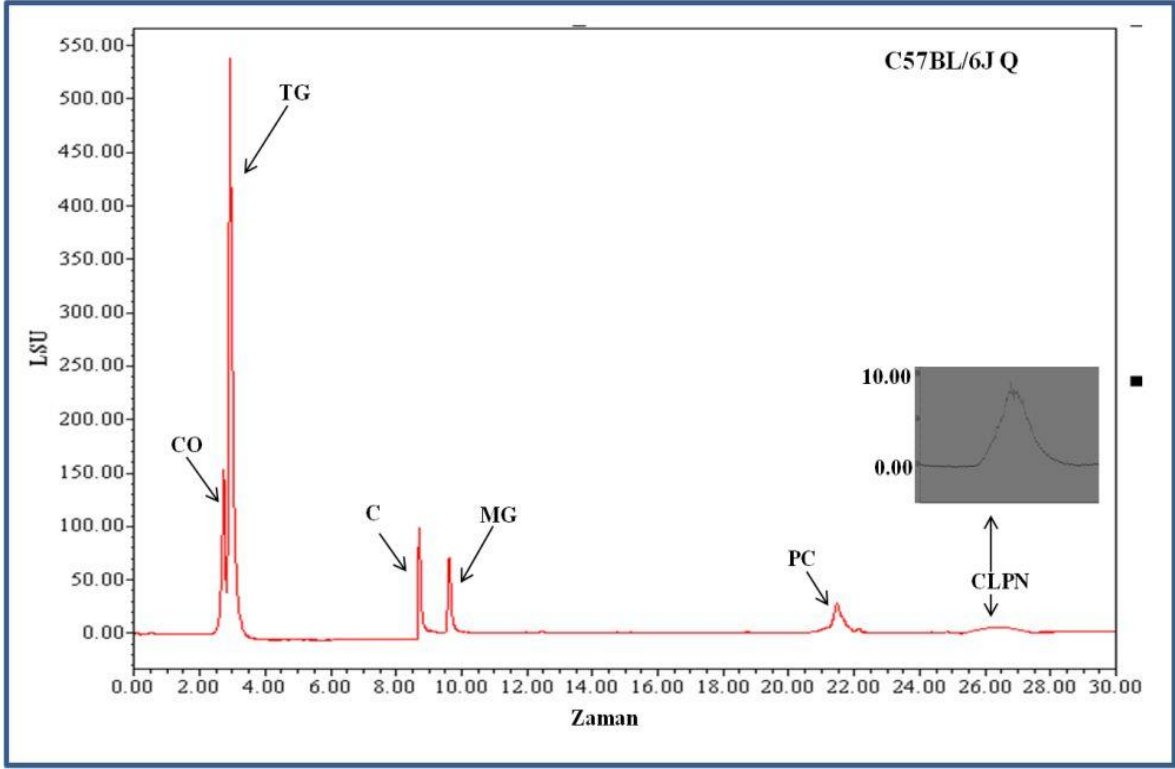
MG





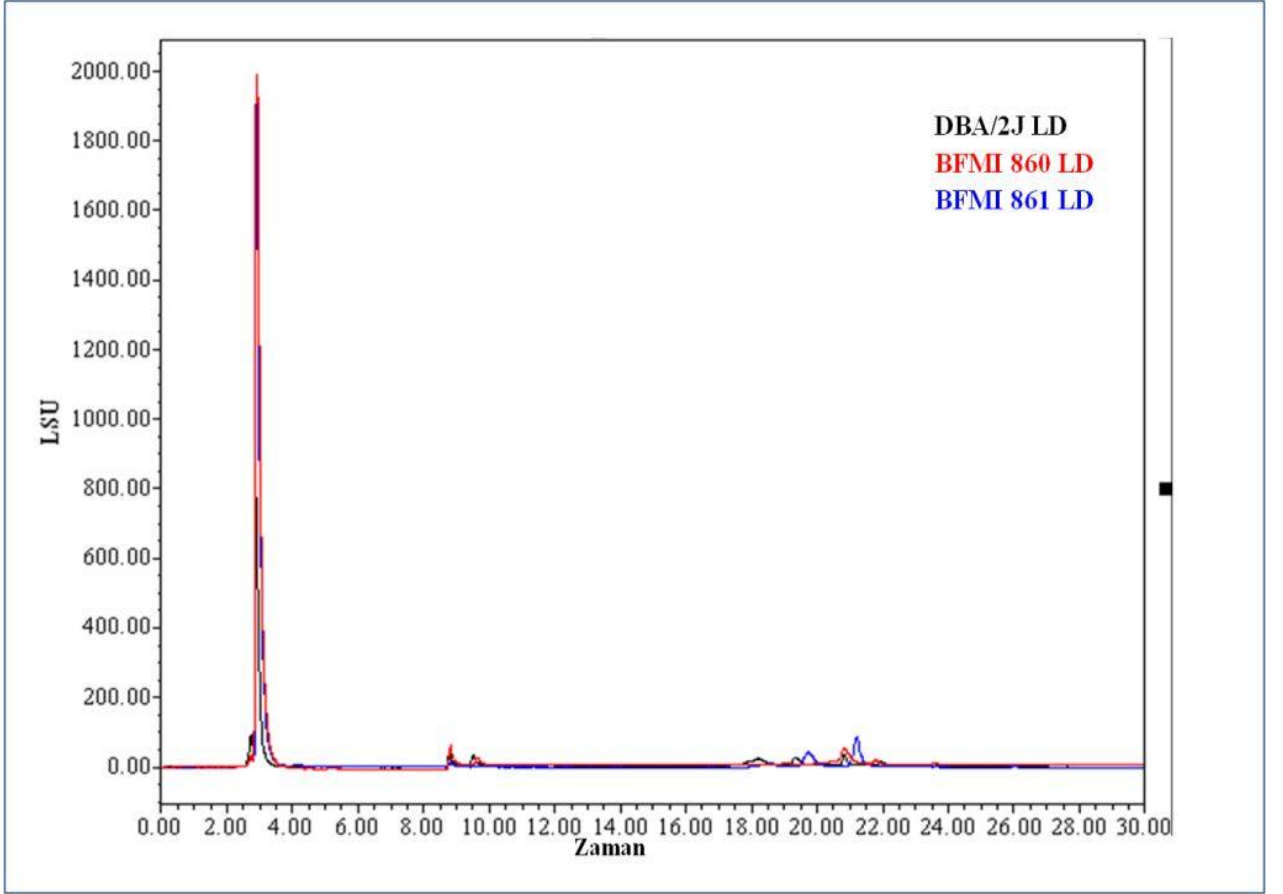
Şekil 37. Deneylerde kullanılan her bir standart lipid için elde edilen kalibrasyon eğrileri. A) Kolesterol oleat (CO), B) Gliseril trioleat (TG), C) Kolesterol (C), D) 1-oleoil-rak-gliserol (MG), E) Fosfatidilkolin (PC), ve F) Kardiyolipin (CLPN). Kırmızı kareler, HPLC’ de yürütülen standartların konsantrasyonlarının alanlarını göstermektedir. Her bir standartın belirleme katsayısı (R^2) bulunmuştur.

Klasik Folch metoduyla iskelet kas dokularından elde edilen lipidlerin, geliştirilen yeni metotla başarıyla ayrıştığı görülmüştür (Şekil 38).

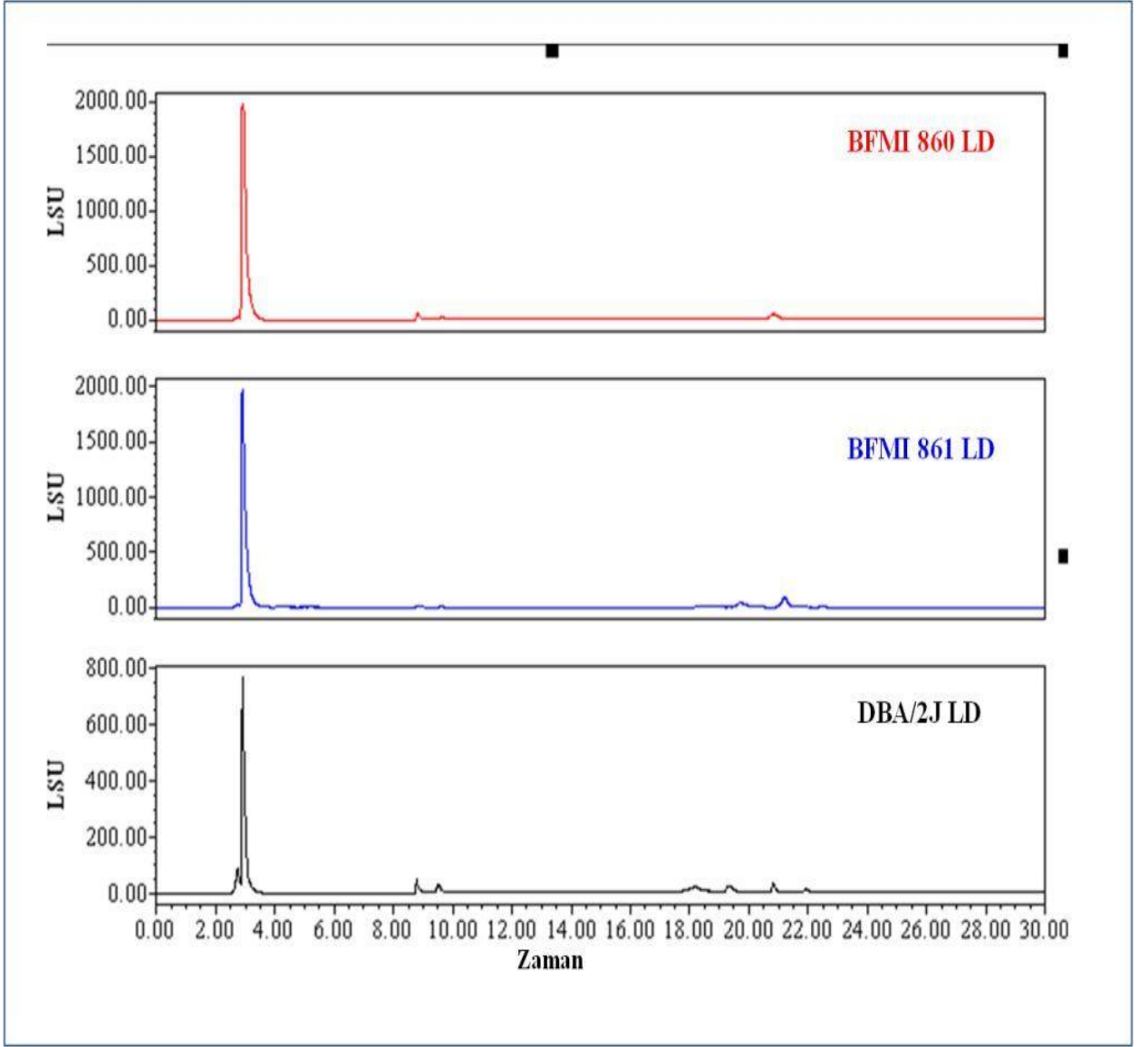


Şekil 38. C57BL/6J kontrol ırkının Q kas dokusunda bulunan HPLC-ELSD kromatogram sonucu.

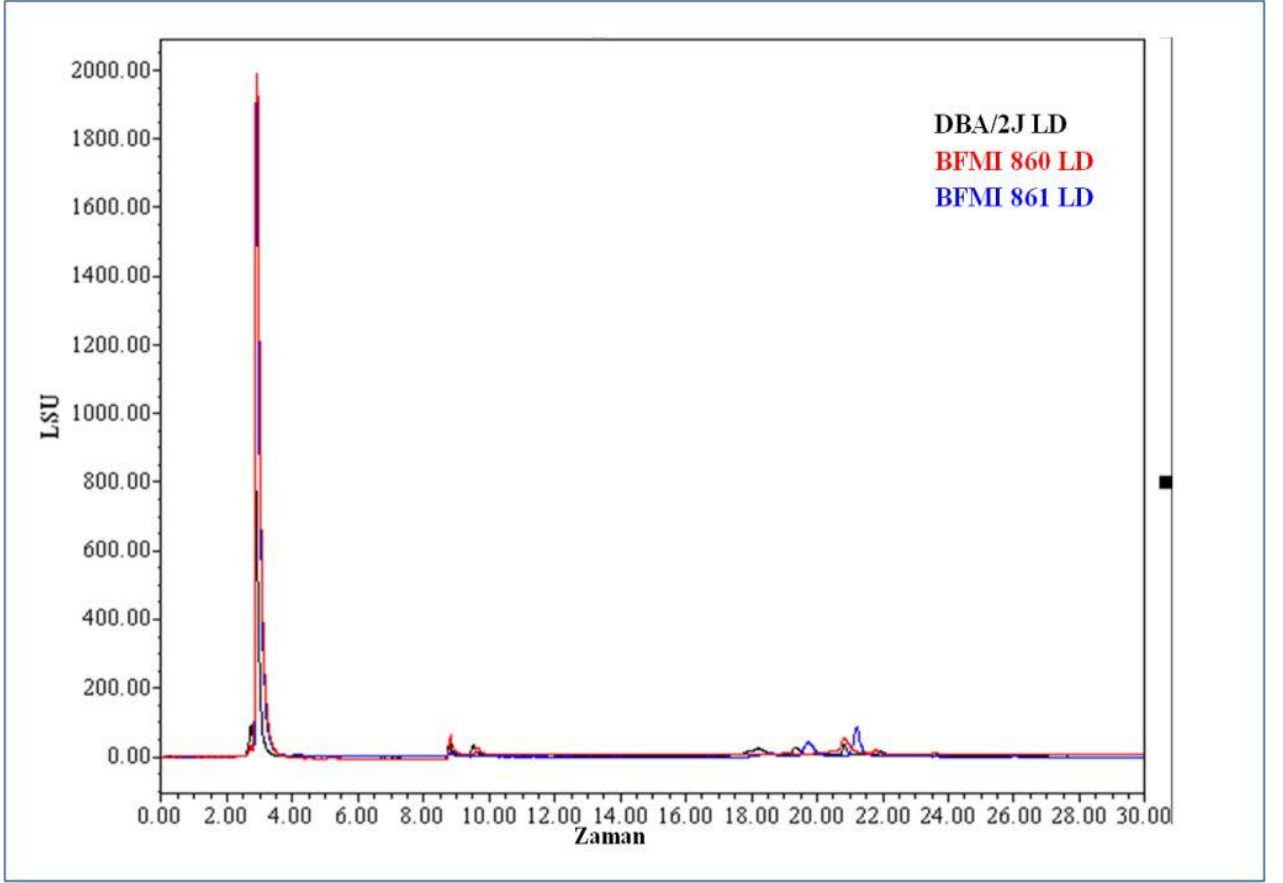
SBD ile beslenmiş olan BFMI obez inbred ırkları ve gene SBD ile beslenmiş olan BMMI ırkları da içeriklerindeki lipit konsantrasyonuna göre ELS dedektörünün hassasiyeti sayesinde nitel olarak ayrılmıştır (Şekiller 39, 40, 41, 42, 43, 44). SBD ile beslenen ırklar arasında en çok lipit BFMI860 fare ırkında bulunurken, lipit fazlalığı açısından bu ırkı BFMI861 fare modeli izlemektedir. BFMI852 ve BFMI856 inbred fare ırklarındaysa, BFMI860 ve BFMI861 ırkları kadar lipit gözükme de, BMMI ırklarıyla karşılaştırılınca daha fazla lipitleri olduğu gözlenmektedir. BMMI ırkları kendi aralarında karşılaştırılacak olunursa, en fazla total lipitin BMMI806 ırkında bulunduğu görülmektedir.



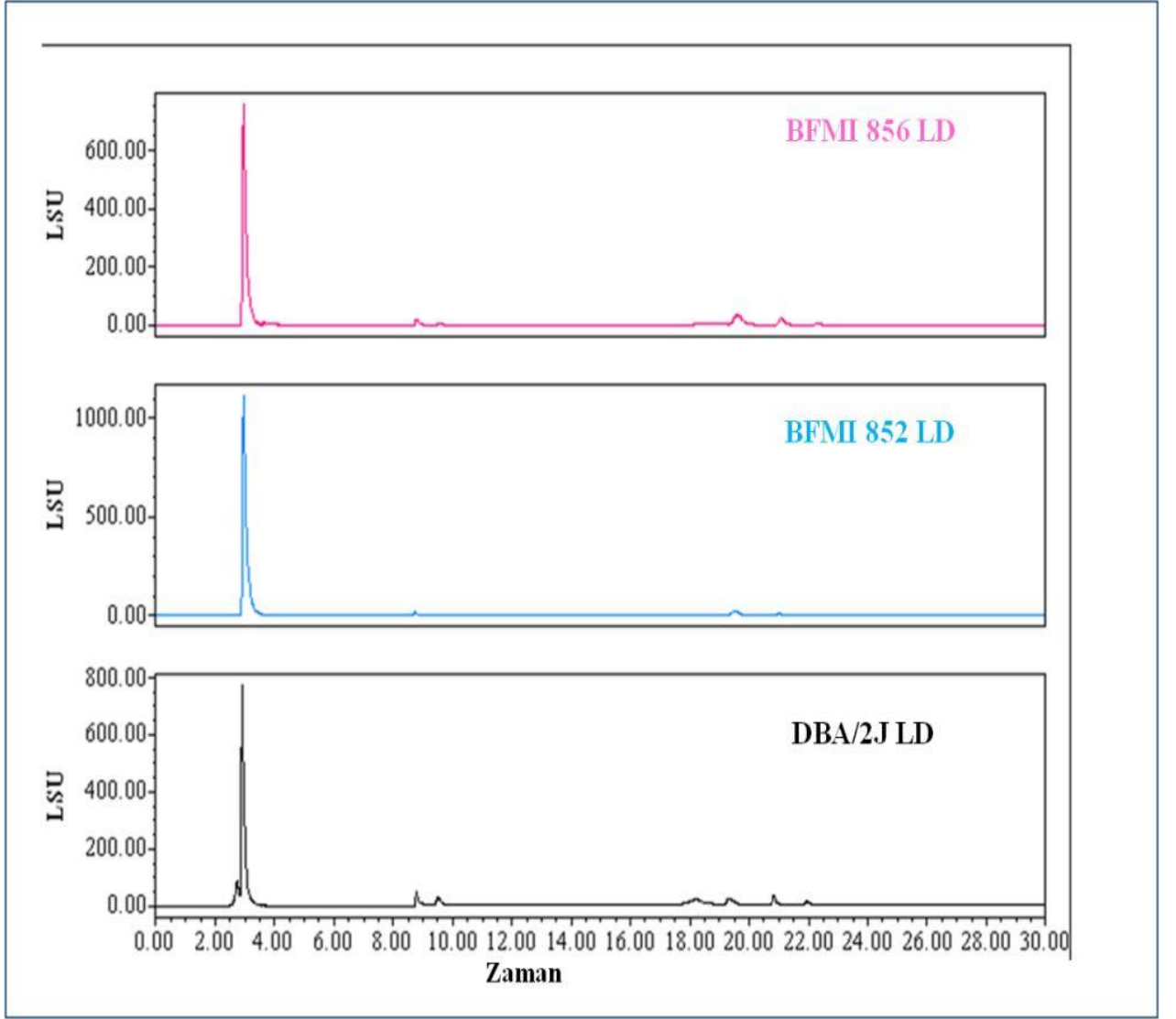
Şekil 39. LD kas dokusundan elde edilen lipidlerin DBA/2J, BFMI860 ve BFMI861 fare ırklarında karşılaştırmalı HPLC-ELSD kromatogram sonuçları.



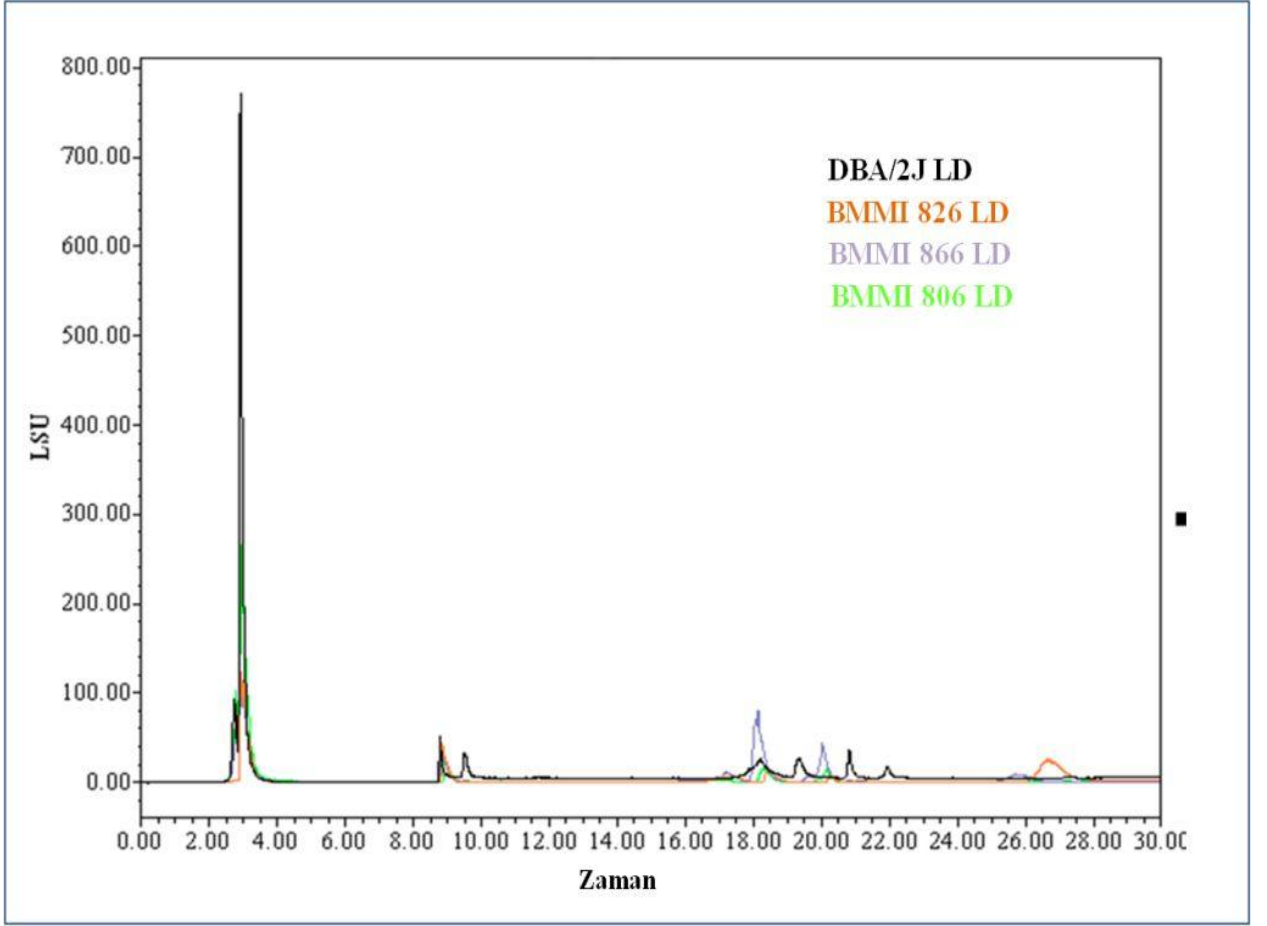
Şekil 40. DBA/2J, BFMI860 ve BFMI861 ırklarının LD kas dokusundan elde edilen lipidlerin tek kromatogramları.



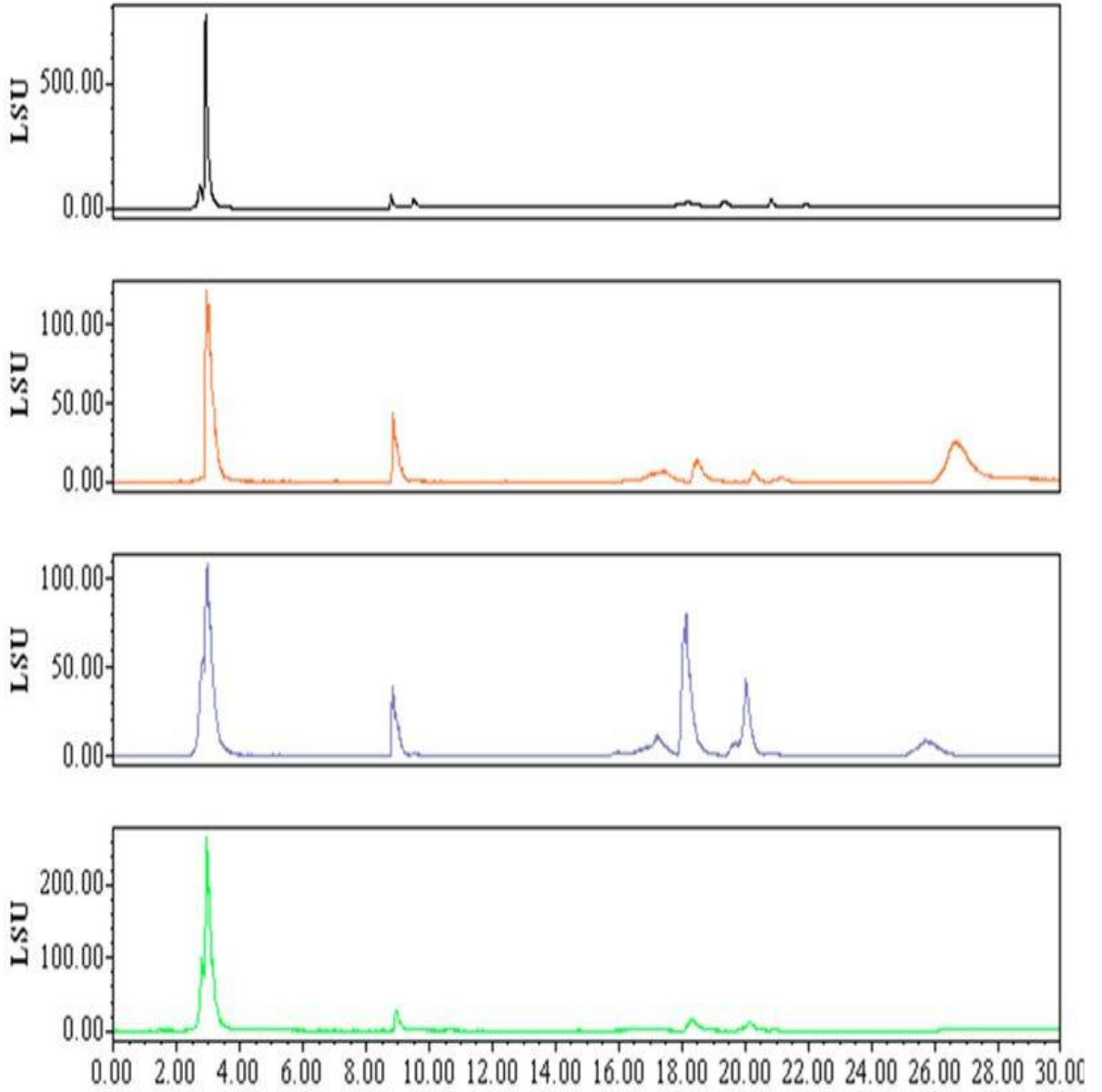
Şekil 41. LD kas dokusundan elde edilen lipidlerin DBA/2J, BFMI852 ve BFMI856 fare ırklarında karşılaştırmalı HPLC-ELSD kromatogram sonuçları.



Şekil 42. DBA/2J, BFMI852 ve BFMI856 ırklarının LD kas dokusundan elde edilen lipidlerin tek kromatogramları.

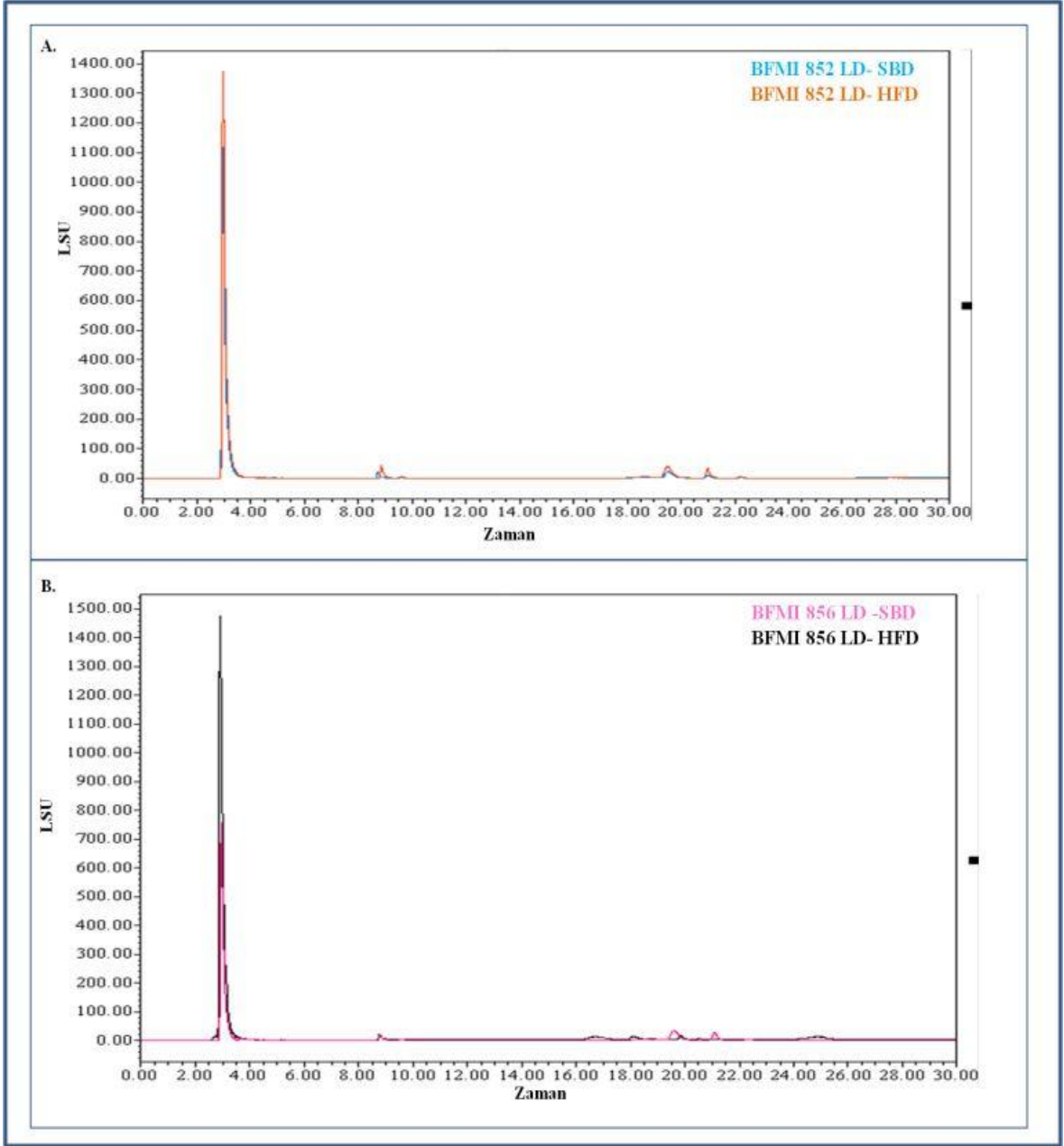


Şekil 43. LD kas dokusundan elde edilen lipidlerin DBA/2J, BMMI806, BMMI826 ve BMMI866 fare ırklarında karşılaştırmalı HPLC-ELSD kromatogram sonuçları.

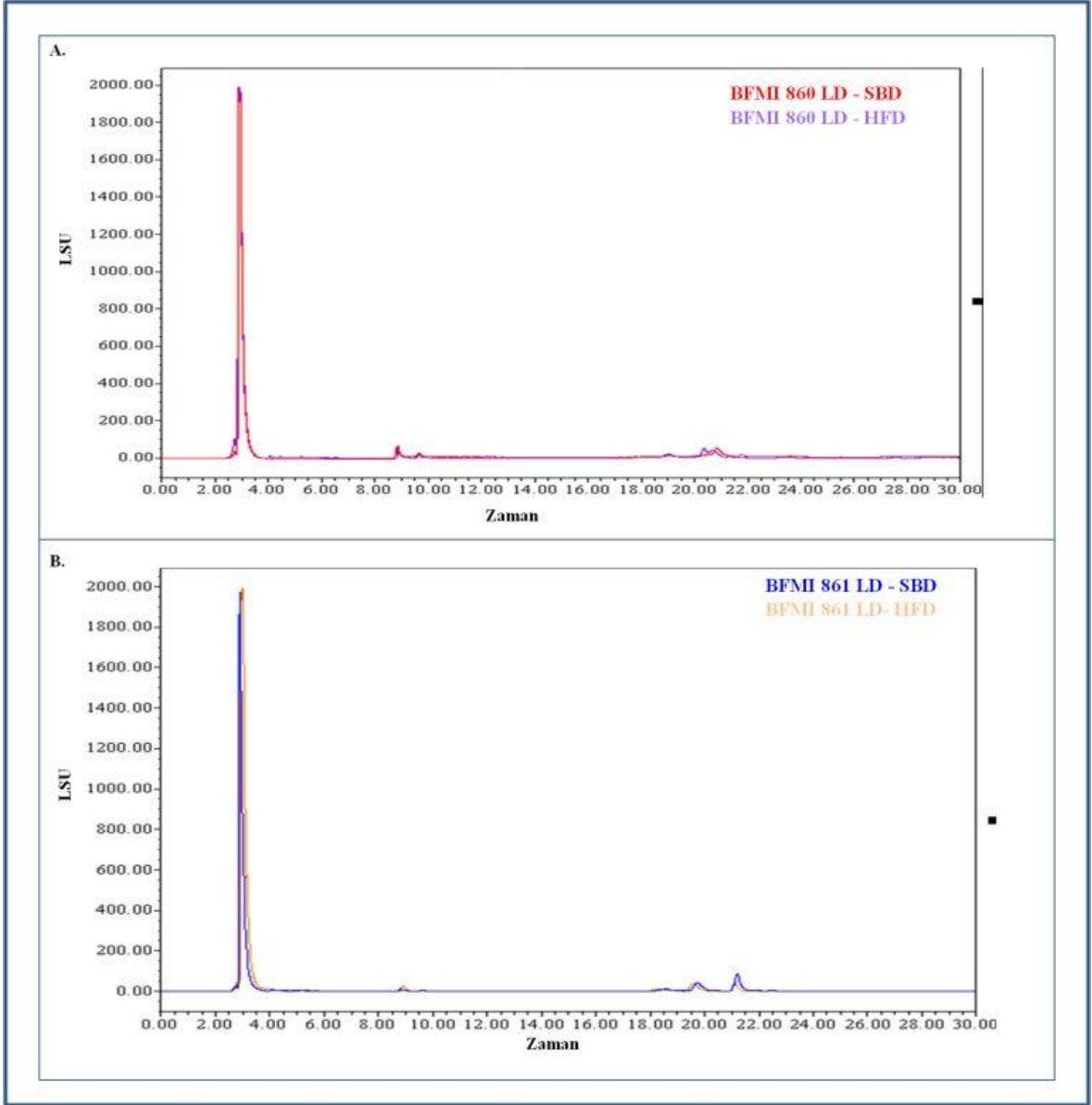


Şekil 44. DBA/2J, BMMI806, BMMI826 ve BMMI866 ırklarının LD kas dokusundan elde edilen lipitlerin tek kromatogramları.

Farklı beslenme şekillerinin fare ırkları üzerindeki etkisi HPLC-ELSD deneyleri ile açıkça ortaya konmuştur (Şekil 45, 46). HFD ile beslenen BFMI ırklarında, SBD ile beslenen ırkdaşlarına göre daha fazla total lipit olduğu gözlenmiştir.



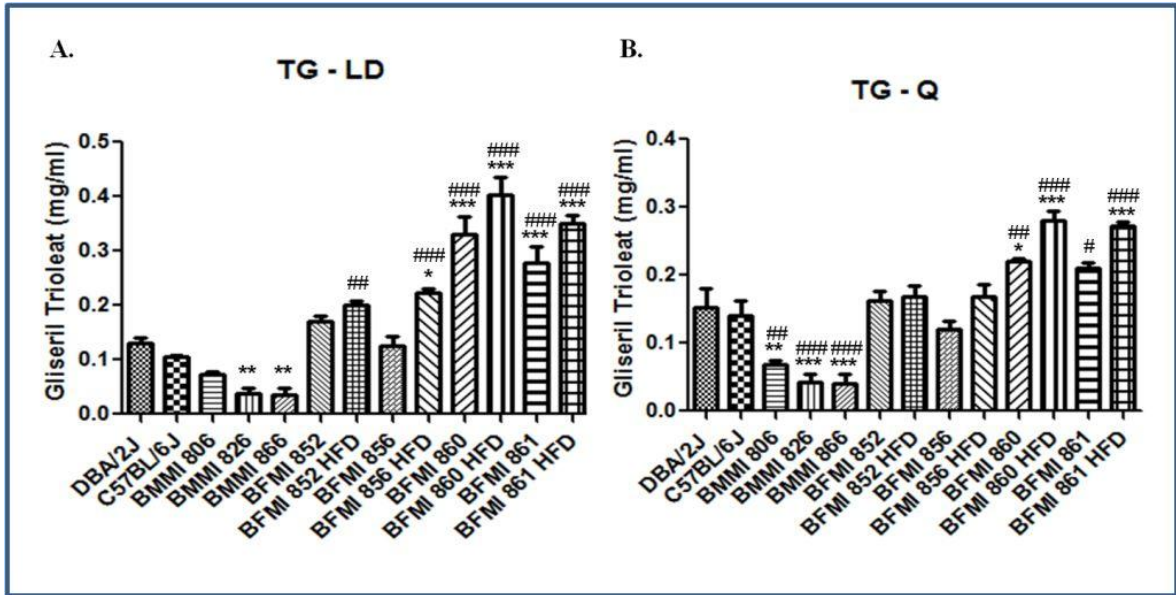
Şekil 45. BFMI fare ırklarının beslenme şekillerine ilişkin karşılaştırmalı HPLC-ELSD kromatogram sonuçları. A) BFMI852-SBD ve BFMI852-HFD. B) BFMI856-SBD ve BFMI856-HFD.



Şekil 46. BFMI fare ırklarının beslenme şekillerine ilişkin karşılaştırmalı HPLC-ELSD kromatogram sonuçları. A) BFMI860-SBD ve BFMI860-HFD. B) BFMI861-SBD ve BFMI861-HFD.

Nitel olarak kromatogramlarda tayin edilen lipidlerin, nicel ölçümleri Waters Empower Pro adlı program kullanılarak yapılmıştır. Her bir standart lipid için çizilen kalibrasyon eğrileri kullanılarak, örneklerdeki lipidlerin konsantrasyon ölçümleri başarıyla yapılmıştır. Bütün örneklerde bulunan lipidlerin istatistiksel analizi Oneway ANOVA yöntemi ve Dunnett's testi kullanarak tüm gruplar kontrol gruplarına göre olacak şekilde karşılaştırılmıştır. Örneklerde tespit edilen lipid türleri olan TG, CO, C, MG, PC ve CLPN' nin LD ve Q kaslarındaki dağılımları bulunmuştur (Şekiller 47, 48, 49, 50, 51 ve 52).

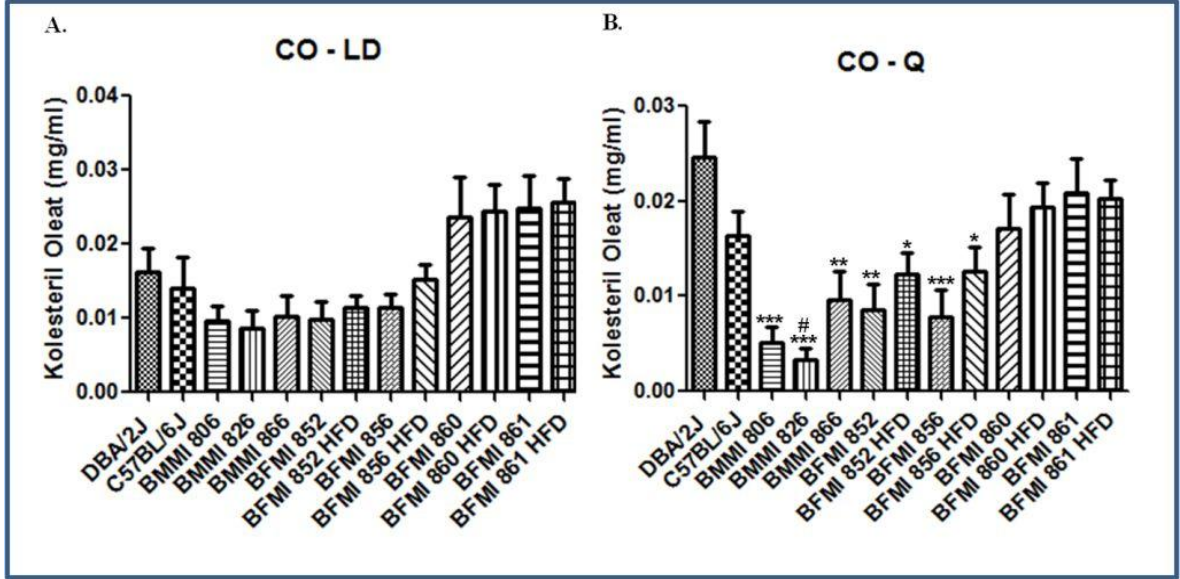
Şekil 47’de SBD ile beslenen kontrol, BMMI ve BFMI ve HFD ile beslenen BFMI ırklarındaki TG konsantrasyonu verilmektedir. BMMI fare ırkları ile BFMI fare ırkları karşılaştırılacak olunursa, inbred obez olan farelerde, TG konsantrasyonunun, kas inbred farelerindeki TG konsantrasyonuna oranının en az iki kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu fazlalığın sebebi, TG gibi basit lipidlerin, canlıların hem fizyolojik durumlarına, hem de diyeteye göre en çok değişen lipidlerden biri olmasından kaynaklanmaktadır (CHRISTIE, 1987). BFMI ırklarındaysa, farelerin fizyolojik durumlarından ötürü daha fazla TG’ye rastlanmıştır. Özellikle BFMI860 ve BFMI861 ırklarında, TG konsantrasyonunun çok yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Çalışılan diğer obez fare ırkları olan BFMI852 ve BFMI856 ırklarında ise, bu iki ırktaki kadar TG görülmemiştir. Her iki diet türünde de, TG konsantrasyonunun LD kasında daha çok görüldüğü ortaya çıkmıştır. HFD ile de beslenmiş olan BFMI ırklarının hepsinde, TG konsantrasyonunun daha çok arttığı tespit edilmiştir. BMMI806 ırkının ise, diğer kas fare ırklarına göre daha çok TG barındırdığı görülmüştür.



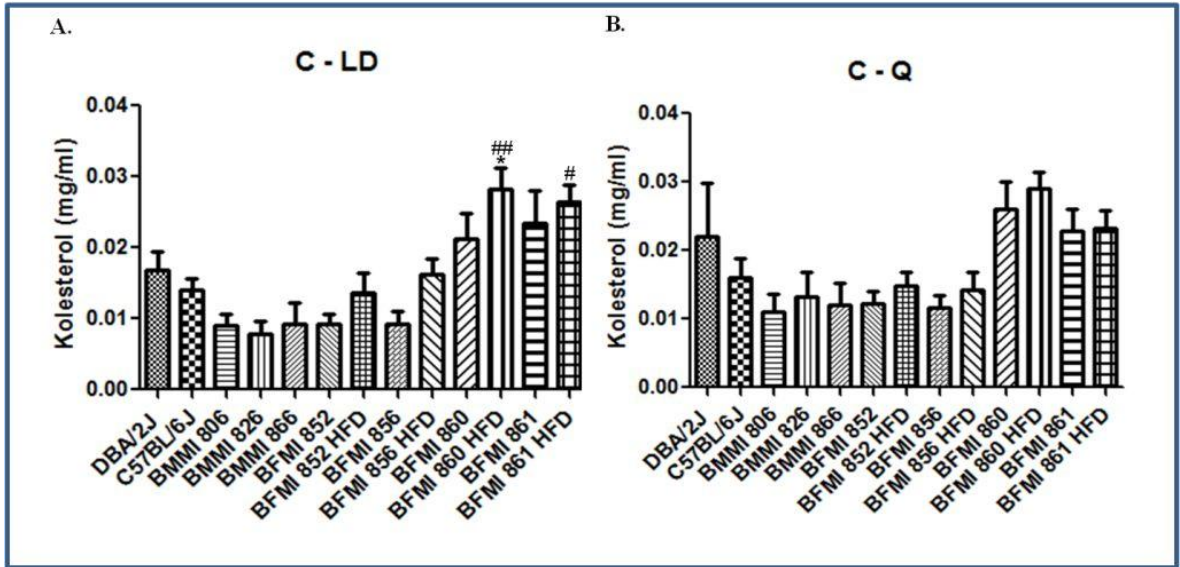
Şekil 47. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen TG (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen TG (mg/ml) miktarı. (Verilen değerler, DBA/2J kontrol ırkına göre anlamlıysa *, C57BL/6J kontrol ırkına göre anlamlıysa # işaretiyle gösterilmiştir.)

Hayvan dokularında çok bulunan bir diğer lipid türü de kolesteroldür. Bu lipid, serbest kolesterol (C) ve esterleşmiş kolesterol, yani kolesteril ester (CO), formlarında bulunmaktadır. Serbest kolesterol zar akışkanlığı gibi elzem bir rolde görev alırken, kolesterolün bu iki formu da, canlı için büyük bir önem arz etmektedir (CHRISTIE, 1987). Üzerinde çalışılan ırklar göz önüne alındığında hem LD hem de Q iskelet kaslarında, C ve

CO lipidlerinin BFMI ırklarında BMMI ırklarına göre dramatik bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 48 ve 49). Bu iki lipid türünün LD tipi iskelet kasında daha çok görüldüğü gözden kaçmamıştır. BFMI ırklarının HFD ile beslenmiş olan bireylerinde ise bu artış daha fazla görülmektedir.

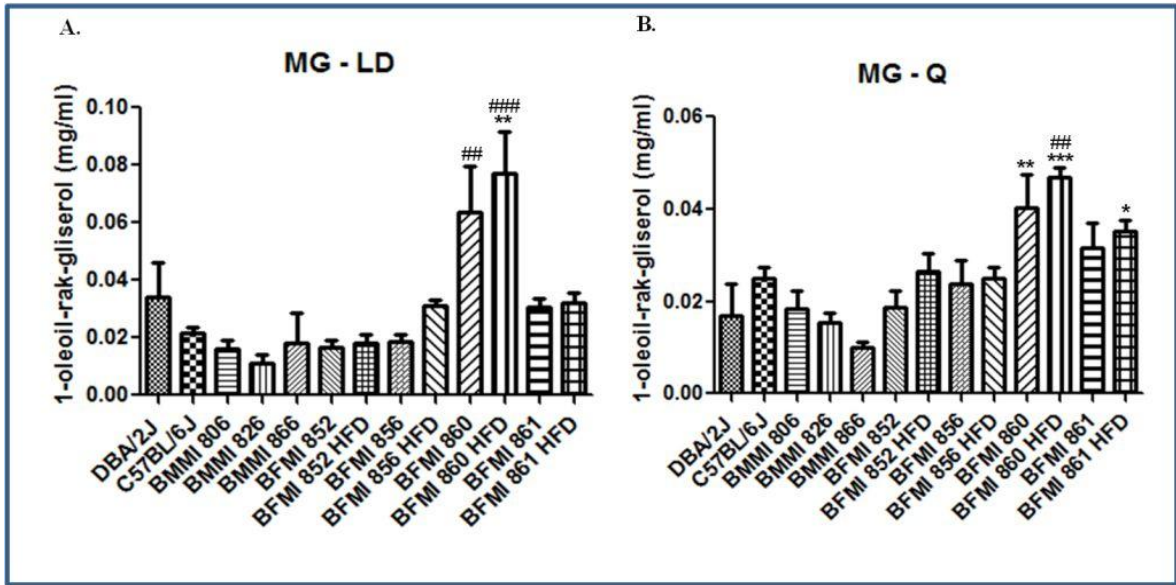


Şekil 48. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen CO (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen CO (mg/ml) miktarı. (Verilen değerler, DBA/2J kontrol ırkına göre anlamlıysa *, C57BL/6J kontrol ırkına göre anlamlıysa # işaretiyle gösterilmiştir.)



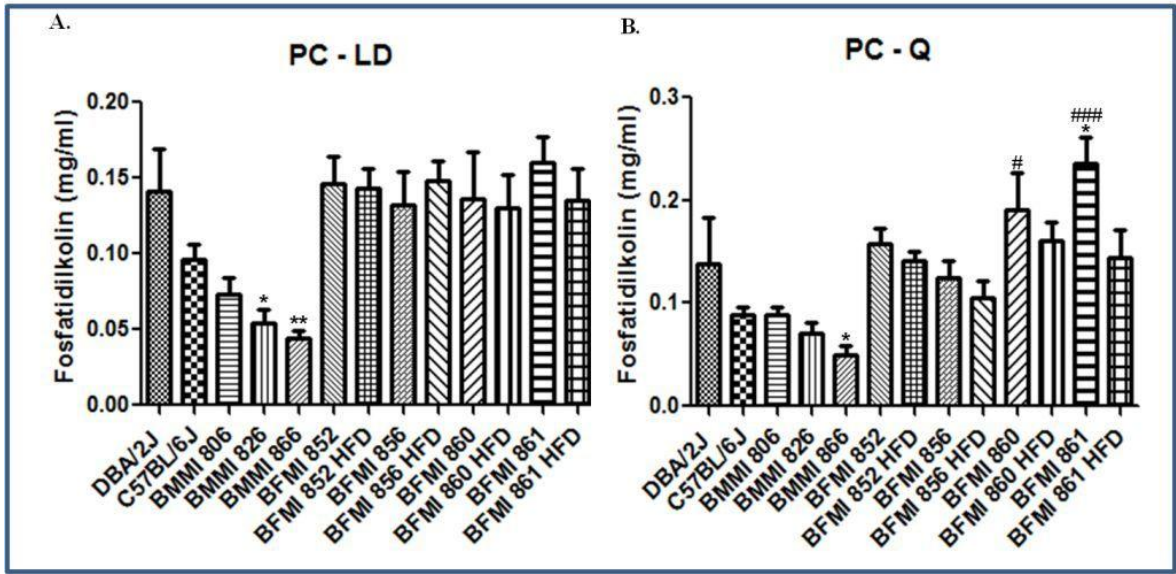
Şekil 49. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen C (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen C (mg/ml) miktarı. (Verilen değerler, DBA/2J kontrol ırkına göre anlamlıysa *, C57BL/6J kontrol ırkına göre anlamlıysa # işaretiyle gösterilmiştir.)

Birer molekül yağ asidi ve gliserolden oluşan bu lipid taze hayvan dokularında az rastlanmaktadır (CHRISTIE, 1987). Şekil 50’de MG lipitinin, SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI, ve HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının LD ve Q kaslarındaki konsantrasyonu verilmiştir. MG lipidi, SBD veya HFD ile beslenmiş olan BFMI860 ırkında yüksek oranda görülmüştür. Diğer lipid türlerinde bulunan sonuçlara paralel olarak, LD kasında Q kasına göre daha fazla MG olduğu tespit edilmiştir.



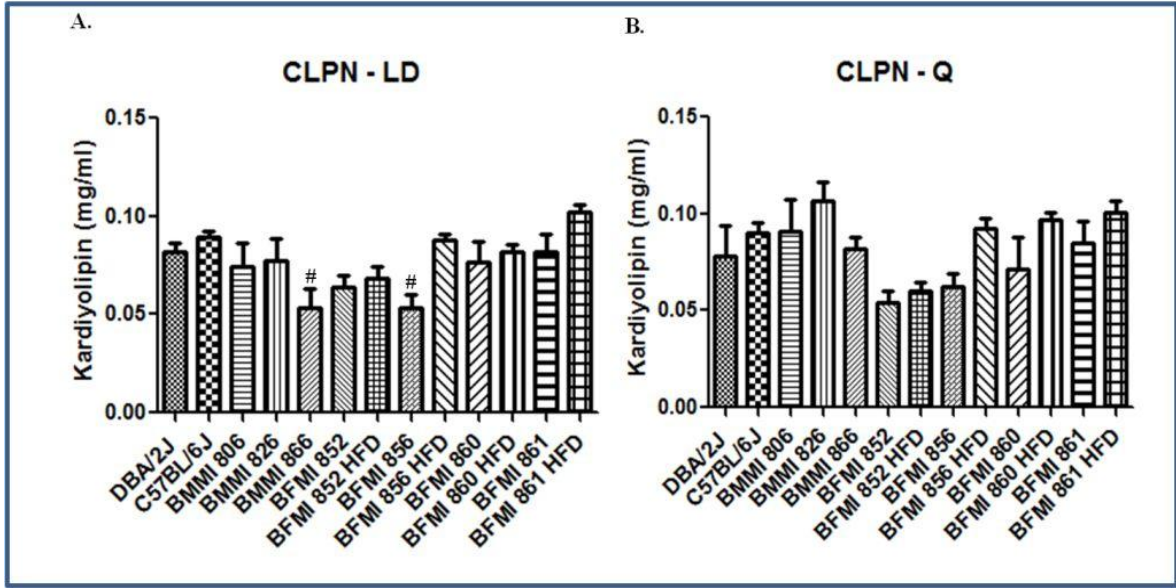
Şekil 50. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen MG (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen MG (mg/ml) miktarı. (Verilen değerler, DBA/2J kontrol ırkına göre anlamlıysa *, C57BL/6J kontrol ırkına göre anlamlıysa # işaretiyle gösterilmiştir.)

Şekil 51’de SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının LD ve Q kaslarındaki PC konsantrasyonu verilmiştir. SBD veya HFD ile beslenen BFMI ırklarında bu lipidin daha çok olduğu görülmüş olup, diet farkının bu lipidin konsantrasyonunda büyük bir farka yol açmadığı tespit edilmiştir. BMMI806 ırkında ise, diğer kas fare ırklarına oranla daha fazla PC bulunmuştur.



Şekil 51. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen PC (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen PC (mg/ml) miktarı. (Verilen değerler, DBA/2J kontrol ırkına göre anlamlıysa *, C57BL/6J kontrol ırkına göre anlamlıysa # işaretiyle gösterilmiştir.)

CLPN, sadece mitokondri organelinin iç zarında bulunan, iki adet fosfatidil ve bir adet gliserol grubundan oluşan bir lipittir. Prokaryotta dahil, bütün canlılarda bulunan bu lipid, tüm memeli dokularında bulunmaktadır (CLAYPOOL, 2009; MCMILLAN ve DOWHAN, 2002; JOSHI v.d., 2008). LD ve Q dokuları iskelet kas dokuları olduklarından dolayı, mitokondri organelinin doğal olarak CLPN lipitin bulunması beklenir. HPLC-ELSD deneyleri ile, bu lipitin iskelet kas dokularında varolduğu gösterilmiştir. Tespit edilen diğer lipidlerin BFMI ırklarında daha fazla gözükmesine rağmen, CLPN' nin konsantrasyonunda BMMI ve BFMI ırkları arasında ve üzerinde çalışılan LD ve Q kasları arasında çok büyük fark olmadığı ortaya çıkmıştır (Şekil 52).



Şekil 52. SBD ile beslenmiş kontrol, BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırklarının, A) LD kaslarından elde edilen CLPN (mg/ml), B) Q kaslarından elde edilen CLPN (mg/ml) miktarı.

Tüm bu kromatogramlardan ve grafiklerden, LD ve Q kas dokularında en çok lipit barındıran ırkların sırasıyla, BFMI860 ve BFMI861 olduğu görülmüştür. Bu ırkların, HFD ile beslendiğinde iskelet kasları içerisinde daha çok lipit depoladığı ortaya çıkmıştır. Depolanan bu lipitler arasındaysa diğerlerinden dramatik olarak yüksek değere sahip olduğu için, en baskın tür olarak TG' nin olduğu gözlemlenmiştir. BMMI ırklarında ise, TG ile beraber CLPN' nin konsantrasyonunun yüksek olduğu görülmüştür.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada 52 nesil boyunca inbred olarak çiftleştirilmek yoluyla obeziteye yatkın olarak seçilen BMMI ve BFMI inbred fareleri iskelet kas dokularının makromoleküllerinde, özellikle lipit içeriğinde, oluşan yapısal ve fonksiyonel değişimlerin tespit edilmesi, bu kaslarda depolanan lipitlerin cinslerinin ve dağılımlarının tayin edilmesi, böylelikle bu farelerin iskelet kaslarının karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, projede iskelet kaslarındaki makromoleküllerin özelliklerinin belirlenmesi için ATR (attenuated total reflectance)-Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, bu makromoleküllerin, özellikle lipitlerin, kaslardaki dağılımının görüntülenebilmesi için FTIR mikrospektroskopisi, kas içeriğindeki lipitlerin hangi kas liflerinde yoğun olarak dağıldığının görüntülenebilmesi için konfokal mikroskopisi ve

depolanan lipitlerin cinslerinin ve miktarlarının belirlenebilmesi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) teknikleri kullanılmıştır.

Bu çalışmada SBD ile beslenmiş erkek kontrol (DBA/2J, C57BL/6J) ve BMMI ırkları ile SBD ile beslenmiş erkek BFMI fareleri ve HFD ile beslenmiş erkek BFMI farelerinin LD ve Q kasları incelenmiştir. Projede incelenen BMMI ırkları içerisinde BMMI806, BFMI ırkları içerisinde BFMI860 ve BFMI861 farelerinin serum glikoz, trigliserit ve esterifiye olmamış yağ asidi seviyelerinde gösterdikleri artışla birlikte, ipITT sonuçlarına göre diğer ırklara nazaran insülin enjeksiyonuna daha geç cevap vermeleri insülin direnci geliştirdiklerine işaret eder. Bu ırkların, bu proje çerçevesinde incelenen tüm spektral, mikroskopik ve kromatografik parametrelerde diğer BMMI veya BFMI ırkları ile karşılaştırıldıklarında yukarıdaki bulguları teyit eden sonuçlar verdikleri tespit edilmiştir.

BMMI806, BFMI860 ve BFMI861 farelerinin iskelet kaslarında daha az doymamış lipit içeriğine ve daha kısa hidrokarbon zincirli lipitlere sahip oldukları görülmüştür. Literatürdeki bazı çalışmalarda, tıpkı bizim BMMI806, BFMI860 ve BFMI861 fare ırkları iskelet kaslarında gözlediğimiz gibi, lipit peroksidasyonunun doymamış yağ asitlerinin kaybına neden olduğu ve daha kısa zincirli lipitlerin oluşmasını sağladığı gösterilmiştir (BRUCH ve THAYER, 1983; CURTIS v.d., 1984; LEVINE ve WETZEL, 1994, BOZKURT v.d., 2010). Lipit peroksidasyonu membranın doymamış/doymuş lipit oranında değişikliğe neden olarak daha katı, esnekliği azalmış bir membran yapısı oluşmasına yol açar (NIRANJAN v.d., 2000). Oluşan bu daha az esnek membran, insülinin reseptörüne doğru ve etkin biçimde bağlanmasında bazı sınırlamalar yaratabilir ve dolayısı ile insülin direnci oluşumuna katkıda bulunabilir (RUSSO, 2009). Ayrıca, membran yapısında bulunan uzun zincirli çoklu doymamış yağ asidi miktarındaki artımın, hücrede bulunan insülin reseptör sayısında ve insülin yoluyla gerçekleşen glikoz taşınmasında değişikliklere neden olabileceği ve insülin duyarlılığını arttırabileceği öne sürülmüştür (STORLIEN v.d., 1991; AYRE v.d., 1998). Bu bilgiler ışığında, projemizde incelenen BMMI806, BFMI860 ve BFMI861 fare ırkları iskelet kaslarında oluşan lipit peroksidasyonunun bu ırklarda görülen insülin direnci gelişimine katkıda bulunduğu söylenebilir.

Projede incelenen BMMI modellerinden BMMI826 ve BMMI866 fare ırkları homozigot myostatin mutasyonuna sahiptir, fakat BMMI806 ırkında myostatin gelişim faktörünü kodlayan gen sorunsuz ifade edilmektedir. Myostatin gelişim faktörü kas gelişimi üzerine olumsuz etkiye sahiptir. Myostatin konsantrasyonu ne kadar artarsa bireyde kas gelişimi o kadar azalmaktadır. Myostatin yokluğunda ise kas gelişimi artmakta ve kas içerisindeki yağ oranı azalmaktadır (GUO v.d., 2009). Yapılan çalışmalarda

myostatin yokluğunun obezite gelişimini azalttığı gösterilmiştir (ZHAO v.d., 2005). Literatürde bulunan bu bilgilere paralel olarak, proje dahilinde incelenen ve myostatin genini sorunsuz ifade eden BMMI806 ırkının obezite geliştirmeye daha yatkın olduğu elde edilen sonuçlarda görülmüştür. **Bu ırkın, özellikle LD kasında, BMMI ırkları içerisinde daha yüksek seviyede trigliserit, kolesterol ester, monogliserit ve fosfatidilkolin içeriğine sahip olduğu, daha fazla sayıda ve büyüklükte lipit damlacıkları içerdiği; dolayısıyla BMMI ırkları içerisinde en yüksek lipit içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.**

Proje Alman ortağının daha önce yaptığı çalışmalarda BFMI ırkları içerisinde BFMI860 farelerinin en yüksek vücut yağ yüzdesine sahip olduğu (MEYER v.d., 2009) ve HFD ile beslendiğinde vücut yağ kitlesinde en fazla artımın da BFMI860 farelerinde gerçekleştiği (WAGENER v.d., 2006) tespit edilmiştir. **Bu çalışmada da BFMI860 ırkının daha fazla trigliserit, kolesterol, kolesterol ester, monogliserit içeriğine, dolayısı ile daha fazla lipit içeriğine sahip olduğu, bu ırkın kaslarında daha fazla sayıda ve daha büyük hacimde lipit damlacığı biriktiği tespit edilmiştir. BFMI861 ırkı da BFMI860 ırkı gibi yüksek lipit içeriğine sahip olmakla birlikte kontrol grupları ile karşılaştırıldığında BFMI860 ırkının daha belirgin farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Tüm BFMI ırkları HFD ile beslendiklerinde iskelet kasının lipit içerikleri artarken, BFMI852 ırkında HFD ile beslenmenin lipit içeriğinde pek bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir. HFD verilmiş gruplar arasında da en fazla lipit içeriği BFMI860 ırkında görülmüştür.**

İskelet kas kesitlerinin görüntüleme yöntemleri ile incelenmeleri sonucunda daha oksidatif bir metabolizmaya sahip olan tip IIa ve ara tip kas liflerinde daha yüksek miktarda nötral lipit biriktiği gözlenmiştir. Lipit birikiminin daha fazla olduğu bu kas liflerinde daha yüksek lipit/protein dağılımı, lipit yapıları içerisinde daha yüksek miktarda metilen (CH_2) grubuna karşılık, daha düşük miktarda metil (CH_3) grubu, yüksek miktarda trigliserit içeriği (karbonil, $\text{C}=\text{O}$) ile daha uzun zincirli lipit yapıları bulunduğu; ayrıca daha yüksek doymamışlık indeksi ve daha düşük glikojen içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Gözlenen bu lipit birikimi, diğer obez ırkları ile karşılaştırıldığında BFMI860 fareleri iskelet kaslarında daha yüksek miktarda gerçekleşmiştir, hatta HFD ile beslenmiş BFMI860 farelerinde daha muazzam bir lipit birikimi olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen nötral lipit içeriğindeki bu artış HPLC çalışmaları ile de gösterilmiş ve özellikle BFMI860 ırklarının iskelet kaslarında, incelenen bazı lipit cinslerinin (trigliserit, kolesterol

ester, monogliserit ve fosfatidilkolin) yüksek miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, kullandığımız diğer tekniklerle de BFMI ırklarının BMMI farelerine göre daha fazla lipit içeriğine sahip oldukları, görülmüştür.

Projede kullanılan BFMI fareleri inbred olarak üretimleri sırasında vücutlarında yüksek yağ oranına sahip olmalarına göre seçildiklerinden dolayı sadece SBD ile beslendiklerinde bile daha belirgin obez modeller olma özelliği göstermektedirler. HFD ile beslenme durumunda ise , ki bu beslenme tarzı modern dünyada yaygın bir beslenme alışkanlığı haline gelmiştir, BFMI farelerinde ölçülen tüm parametrelerde BMMI ve kontrol gruplarına göre daha muazzam farklar açığa çıkmıştır. **Bu da bize, diyetin obezite gelişiminde en az genetik faktörler kadar önemli olduğunu göstermektedir.**

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, projede incelenen karmaşık genetik yapıya sahip olmaları nedeniyle insanlarda da görülen ve kendiliğinden gelişen obeziteye model oluşturan inbred fare ırklarından **BFMI860 ve BMMI806 farelerinin obezite çalışmalarına daha uygun oldukları belirlenmiştir.** Ayrıca, çalışmamız sonuçlarına göre, vücudun duruşundan sorumlu olan (ONO v.d., 1995) ve daha fazla tip IIa kas lifi içerdiği rapor edilen (HAMELIN v.d., 2007) **incelenen parametreler göz önüne alındığında LD kasının Q kasından daha fazla etkilediği anlaşılmıştır.**

İskelet kas dokusundaki bozulan insülin duyarlılığı diyabet ve obezite patolojisindeki ilk belirtilerden biridir. İskelet kasında insülin direnci henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamış olmakla beraber son yıllarda, iskelet kasında biriken lipit bileşenlerinin ve dağılımlarının insülin direnci oluşumunda belirleyici faktörler olduklarına yönelik bulgular artmaktadır. Bu nedenle, bu proje çalışması sonucunda rapor edilen iskelet kasında biriken lipitlerin doku içerisindeki dağılımlarının ve bileşenlerinin belirlenmesi, değişik kas lifi tiplerinin lipit birikimi üzerindeki etki seviyelerinin ve bu liflerde biriken lipitlerin özelliklerinin belirlenmesi bulguları obezitede insülin direnci oluşum mekanizmasının açıklanabilmesi için gereklidir. Bu projede uygulanan biyofiziksel ve biyokimyasal metotlarla iskelet kaslarının yukarıda bahsedilen detaylı karakterizasyonu yapılmış ve obezite gelişimine ışık tutacak değerli bilgiler elde edilmiştir. Bu nedenle, elde edilen bu orijinal sonuçlar literatüre obezitenin oluşum mekanizmasını açıklayıcı yönde katkıda bulunacaktır.

KAYNAKÇA

AGUIRRE V., Uchida T., Yenush L., Davis R., White M.F., The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)., *J Biol Chem*, 275:9047-9054, (2000).

ALO F., Brun P., Cont C., Gorgini E., Rubi C., Tosi G., Fourier Transform Spectroscopy,: *11th International Conference, The American Institute of Physics*, (1998).

AWAYDA M.S., Shao W., Guo F., Zeidel M., Hill W.G., ENaC-membrane interactions: regulation of channel activity by membrane order, *J. Gen. Physiol.*, 123: 709-727 (2004).

AYRE K.J., Phinney S.D., Tang A.B., Stern J.S., Exercise training reduces skeletal muscle membrane arachidonate in the obese (fa/fa) Zucker rat, *Journal of Applied Physiology*, 85, 1898–1902, (1998).

BALISTRERI C.R., Caruso C. Candore G., The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases, *Mediators of Inflammation*, doi:10.1155/2010/802078, (2010).

BANYAY M., Sarkar M., Graslund A., A library of IR bands of nucleic acids in solution, *Biophysical Chemistry*, 104, 477–488, (2003).

BAYARI S.H., Utku H., Ikemoto Y., Celasin B., Kömürcü M., Atik A., Synchrotron FTIR microspectroscopic analysis of necrotic bone, *Spectroscopy*, 21(4), 227-234, (2007).

BIZEAU M.E., Salano J.M., Jeffrey R., Menhaden oil feeding increases lypolysis without changing plasma membrane order in isolated rat adipocytes, *Nutrition Research*, 20(11), 1633-1644, (2000).

BORKMAN M., Storlien L.H., Pan D.A., Jenkins A.B., Chisholm D.J., Campbell L.V., The Relation Between Insulin Sensitivity and The Fatty-Acid Composition of Skeletal-Muscle Phospholipids, *N Engl J Med*, 328, 238-244, (1993).

BOSKEY A. ve CAMACHO N.P., FT-IR Imaging of Native and Tissue Engineered Bone and Cartilage, *Biomaterials*, 28, 2465-2478, (2007).

BOYAR H., Severcan F., Tamoxifen-Phospholipid Model Membrane Interactions: An FT-IR Study, *J. Molecular Structure*, 408/409, 265-268, (1997).

BOYAR H., Zorlu F., Mut M., Severcan F., The effects of chronic hypoperfusion on rat cranial bone mineral and organic matrix: A fourier transform infrared spectroscopy study, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379 (3), 433-438, (2004).

BOZKURT O., Bilgin M.D., Severcan F., The Effect of Diabetes Mellitus on Rat Skeletal Extensor Digitorum Longus Muscle Tissue: An FTIR Study, *Spectroscopy An Int. J*, 21(3), 151-160, (2007).

BOZKURT O., Severcan M., Severcan F., Diabetes induces compositional, structural and functional alterations on rat skeletal soleus muscle revealed by FTIR spectroscopy: a comparative study with EDL muscle, *Analyst*, 135(12):3, 110-9, (2010).

BRUCH R. C., Thayer W.S., Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes, *Biochim. Biophys. Acta*, 733, 216-222, (1983).

CAKMAK G., Togan I., Severcan F., FT-IR spectroscopic analysis of rainbow trout liver exposed to nonylphenol, *Applied Spectroscopy*, 57 (7), 835-841, (2003).

CAKMAK G., Togan I., Severcan, F., 17 β -estradiol induced compositional, structural and functional changes on rainbow trout liver, revealed by FTIR spectroscopy: A comparative study with nonylphenol, *Aquatic Toxicology*, 77(1), 53-63, (2006).

CAKMAK G, Zorlu F, Severcan M, F. Severcan, Screening of protective effect of amifostine on radiation-induced structural and functional variations in rat liver microsomal membranes by FT-IR Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 83 (7), 2438-2444 , (2011).

CAKMAK G., Miller L.M., Zorlu F., Severcan F., Amifostine, a Radioprotectant Agent, Protects Rat Brain Tissue Lipids against Ionizing Radiation Induced Damage: An FTIR Microspectroscopic Imaging Study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, In press, 10.1016/j.abb.2012.02.012, (2012).

CAMACHO N.P., Rinnerthaler S., Paschalis E.P., Mendelsohn R., Boskey A.L., Fratzl P., Complementary Information on Bone Ultrastructure from Scanning Small Angle X-ray Scattering and Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, *Bone*, 25, 287-293, (1999).

CAMACHO N.P., West P., Torzilli P.A., Mendelsohn R., FTIR Microscopic Imaging of Collagen and Proteoglycan in Bovine Cartilage, *Biopolymers*, 62(1), 1-8, (2001).

CAMERON P.G., CHARETTE G.M., Automation of Fourier Transform Infrared of Temperature-Induced Phenomena, *Appl. Spectrosc.*, 35, 224, (1981).

CASAL H. L., Cameron, D. G., Smith, I. C. P., and Mantsch, H. H., Fourier transform infrared spectra of *A. Laidlawii* membranes, *Biochemistry*, 19, 444-451, (1980).

CASAL H. L., Mantsch, H. H., Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy, *Biochim Biophys Acta*, 779, 381-401, (1984).

CHIRIBOGA L., Yee H., Diem M., Infrared spectroscopy of human cells and tissue. Part VII: FT-IR microscopy of DNAase- and RNAase-treated normal, cirrhotic, and neoplastic liver tissue., *Appl Spectrosc.*, 54:480-5.v.d., (2000).

CHRISTIE W.W., High-performance Liquid Chromatography: Theoretical Considerations and Equipment, High-performance Liquid Chromatography and Lipids, Pergamon Press, Oxford, (1987), pp. 12-23.

CHRISTIE W.W., Lipids: Their Structures and Occurrence, High-performance Liquid Chromatography and Lipids, Pergamon Press, Oxford, (1987), pp. 44-60.

CHRISTIE W.W., Detectors for High-Performance Liquid Chromatography of Lipids with Special Reference to Evaporative Light-Scattering Detection, *Advances in Lipid Methodology – One*, pp. 239-271, (1992).

CLAYPOOL S.M., Cardiolipin, a critical determinant of mitochondrial carrier protein assembly and function, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 2059–2068, (2009).

CORTES V.A., Curtis D.E., Sukumaran S., Shao X., Parameswara V., Rashid S., Smith A.R., Ren J., Esser V., Hammer R.E., Agarwal A.K., Horton J.D., Garg A., Molecular mechanisms of hepatic steatosis and insulin resistance in the AGPAT2-deficient mouse model of congenital generalized lipodystrophy, *Cell Metab*, Feb, 9,2,165-76, (2009).

CURTIS M.T., Gilfor D., Farber J.L, Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes, *Arch. Biochem.Biophys.*, 35, 644–649, (1984).

DEFRONZO R.A., Jacot E., Jequier E., Maeder E., Wahren J., Felber J.P., The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose, *Diabetes*, 30:1000-1007, (1981).

DESCALZO A.M., Insani E.M., Pensel N.A., Light-Scattering Detection of Phospholipids Resolved by HPLC, *Lipids*, 38, no. 9, 999-1003, (2003).

DIEM M., Boydston-White S., Chiriboga L., Infrared spectroscopy of cells and tissues: shining light onto a novel subject, *Applied Spectroscopy*, 53, 148A-161A., (1999).

DOGAN A., Ergen K., Budak F., Severcan F., Evaluation of Disseminated Candidiasis on an Experimental Animal Model: An FTIR Study, *Applied Spectroscopy*, 61(2), 199-203, (2007).

DOVBESHKO G. I., Gridina N. Y., Kruglova E. B., Pashchuk O. P., FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage, *Talanta*, 53, 233-246, (2000).

EL-HASCHIMI K., Pierroz D.D., Hileman S.M., Bjorbaek C., Flier J.S., Two Defects Contribute to Hypothalamic Leptin Resistance in Mice with Diet-induced Obesity, *J. Clin. Invest.*, 105,1827–1832, (2000).

Empower 2 Data Acquisition and Processing Theory Guide.

FAIN J.N., Release of Inflammatory Mediators by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily by the Nonfat Cells: A Review, *Mediators of Inflammation*, doi:10.1155/2010/513948, (2010).

FERNANDEZ D.C., Bhargava R., Hewitt S.M., Levin I.W., Infrared spectroscopic imaging for histopathological recognition., *Nat Biotechnol*, 23(4), 469-474, (2005).

FOLCH J., Lees M., Sloane-Stanley G.H., A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissue, *J. Biol. Chem*, No. 226, 497-509, (1957).

FREIFELDER D., Applications to biochemistry and molecular biology, *Physical Chemistry*, Freeman Press, W. H. (Ed), New York, (1982), pp. 145.

FUKUYAMA Y., Yoshida S., Yanagisawa S., Shimizu M., A Study on the Differences Between Oral Squamous Cell Carcinomas and Normal Oral Mucosas Measured by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Biospectroscopy*, 5, 117-126, (1999).

FURLER S.M., Oakes N.D., Watkinson A.L., Kraegen E.W., A high-fat diet influences insulin-stimulated posttransport muscle glucose metabolism in rats, *Metabolism*, 46, 1101–1106, (1997).

FURUKAWA S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I., Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome *J Clin Invest*. 2004 Dec,114(12), 1752-61, (2004).

GARIP S., Gozen A.C., Severcan F., Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of Bacillus and Micrococcus isolates, *Food Chemistry*, 113(4), 1301-1307, (2009).

GASPER R., Dewelle J., Kiss R, Mijatovic T., Goormaghtigh E., IR Spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788, 1263-1270, (2009).

GAZI E., Baker M., Dwyer J., Lockyer N.P., Gardner P., Shanks J.H., Reeve R.S., Hart C.A., Clarke N.W., Brown M.D., A correlation of FTIR spectra derived from prostate cancer biopsies with gleason grade and tumor stage, *European Urology*, 50: 750-761, (2006).

GEDIK O., Obezite ve çevresel faktörler, *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2003; 7(Suppl 2), 1-4, (2003).

GERICH J.E., Contributions of Insulin-Resistance and Insulin-Secretory Defects to the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus, *Mayo Clin Proc*, 78, 447–456, (2003).

GOODPASTER B.H., Thaete F.L., Simoneau J.A., Kelley D.E., Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat, *Diabetes*, 46, 1579-1585, (1997).

GOODPASTER B.H., Thaete F.L., Kelley D.E., Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus, *Am J Clin Nutr*, 71, 885–92, (2000a).

GOODPASTER B.H., Thaete F.L., Kelley D.E., Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss, *Metabolism*, 49, 467–472, (2000b).

GOODPASTER B.H., He J., Watkins S., Kelley D.E., Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes, *J Clin Endocrinol Metab*, 86:5755-5761,(2001).

GOODPASTER B.H., Wolf, D., Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes, *Pediatric Diabetes*, 5: 219-226, (2004).

GORGULU T. S., Dogan M., Severcan F., A Novel Method In The Characterization of Higher Plants: FTIR Spectroscopic Study of Ranunculus, Acantholimon and Astragalus, *Applied Spectroscopy*, 61(3), 300-308, (2007).

GOUGH K.M., Zelinski D., Wiens R., Rak M., Dixon I.M.C., Fourier transform infrared evaluation of microscopic scarring in the cardiomyopathic heart: Effect of chronic AT1 suppression, *Analytical Biochemistry*, 316, 232-242, (2003).

GRIEBE M., Daffertshofer M., Stroick M., Syren M., Ahmad-Nejad P., Neumaier M., Backhaus J., Hennerici M.G., Fatar M., Infrared spectroscopy: A new diagnostic tool in Alzheimer disease, *Neurosci Lett*, 420(1), 29-33, (2007).

GUO T., Jou W., Chanturiya T., Portas J., Gavrilova O., McPherron A.C., Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity, *PLoS One*, 4(3):e4937, 1-11, (2009).

HAMELIN M., Sayd T., Chambon C., Bouix J., Bibe B., Milenkovic D., Leveziel H., Georges M., Clop A., Marinova P., Laville E., Differential expression of sarcoplasmic proteins in four heterogeneous ovine skeletal muscles, *Proteomics*, 7, 271–280, (2007).

HAN D.H., Nolte L.A., Ju J.S., Coleman T., Holloszy J.O., Semenkovich C.F., UCP-mediated energy depletion in skeletal muscle increases glucose transport despite lipid accumulation and mitochondrial dysfunction, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, E347–E353, (2004).

HARIS P. ve SEVERCAN F., FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media, *J. Molecular Catalysis: B (Enzymatic)*, 7, 207-221, (1999).

HE J., Watkins S., Kelley D.E., Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity, *Diabetes*, 50, 817-823, (2001).

HEGARTY B.D., Furler S.M., Ye J., Cooney G.J., Kraegen E.W., The role of intramuscular lipid in insulin resistance, *Acta Physiol Scand*, 178, 373–383, (2003).

HOTAMISLIGIL G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M., Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance, *Science*, 259, 87–91, (1993).

HOTAMISLIGIL G.S., Peraldi P., Budavari A., Ellis R., White M.F., Spiegelman B.M., IRS-1-Mediated Inhibition of Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity in TNF- α and Obesity-Induced Insulin Resistance, *Science*, 271, 665– 668, (1996).

HOTAMISLIGIL G.S., Inflammatory pathways and insulin action, *International Journal of Obesity*, 27, 53–55, (2003).

HOTAMISLIGIL G.S., Role of Endoplasmic Reticulum Stress and c-Jun NH2-Terminal Kinase Pathways in Inflammation and Origin of Obesity and Diabetes, *Diabetes*, 54, Suppl. 2, S73–S78, (2005).

IVERSON S.J., Lang L.C.S., Cooper M.H., Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue, *Lipids*, 36, no. 11, 1283-1287, (2001).

JACKSON M., Ramjiawan B., Hewko M., Mantsch H. H., Infrared microscopic functional group mapping and spectral clustering analysis of hypercholesterolemia rabbit liver, *Cell. Mol. Biol.*, 44(1), 89-98, (1998).

JOSHI A.M., Zhou J., Gohil V.M., Chen S., Greenberg M.L., Cellular functions of cardiolipin in yeast, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793, 212–218, (2009).

KAHN B.B., Flier J.S., Obesity and insulin resistance, *The Journal of Clinical Investigation*, 106:4, 473-481, (2000).

KARST S., Schmitt A., Brockmann G. A Novel Method For Measuring Of Fat Content In Low-weight Tissue: A NMR Study, *WebmedCentral OBESITY*, 2010;1(12):WMC001368, (2010).

KANETY H., Hemi R., Papa M.Z., Karasik A., Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1, *J. Biol. Chem.*, 271, 9895–9897, (1996).

KAZARIAN S. ve CHAN K., Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(7): 858-867, (2006).

KIDDER R., Ziegler C., Wessels J.M., γ -Irradiation and UV-C light-induced lipid peroxidation: A Fourier transform-infrared absorption spectroscopic study, *Int. J. Radiat. Biol.*, 71(5), 561-571, (1997).

KNEIPP J., Lasch P., Baldauf E., Beekes M., Naumann D., Detection of pathological molecular alterations in scrapie-infected hamster brain by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, *BBA*, 1501, 189-199, (2002).

KNOWLER W.C., Barrett-Connor E., Fowler S.E., Hamman R.F., Lachin J.M., Walker E.A., Nathan D.M., Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin, *N Engl J Med.*, Feb 7;346(6),393-403, (2002).

KRAFFT C., SERGO V., Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues, *Spectroscopy*, 20, 195–218, (2006).

KRETLOW, A., Wang, Q., Beekes, M., Naumann, D., and Miller, L. M., Changes in protein structure and distribution observed at pre-clinical stages of scrapie pathogenesis, *Biochimica et biophysica acta*, 1782(10): 559-565, (2008).

KUHLMANN J., Neumann-Haefelin C., Belz U., Kramer W., Jureschke H.P., Herling A.W., Correlation between insulin resistance and intramyocellular lipid levels in rats, *Magnetic Resonance in Medicine*, 53: 6, 1275–1282, (2005).

- LAGO F., Gómez R., Gómez-Reino J.J., Dieguez C., Gualillo O., Adipokines as novel modulators of lipid metabolism, *Trends in Biochemical Sciences*, 34:10, 500–510, (2009).
- LEFAUCHEUR L. ve GERRARD D., Muscle fiber plasticity in farm mammals, *Proceedings of the American Society of Animal Science*, 1-19, (1998).
- LEFTEROVA M.I. ve LAZAR M.A., New developments in adipogenesis, *Trends Endocrinol Metab.*, 20:3,107-14, (2009).
- LESKOVJAN A.C., Kretlow A., Miller L.M., Fourier transform infrared imaging showing reduced unsaturated lipid content in the hippocampus of a mouse model of Alzheimer's disease. *Anal Chem*, 82, 2711-2716, (2010).
- LEVINE S.M., Wetzel D.L., Chemical analysis of multiple sclerosis lesions by FT-IR microspectroscopy, *Free Radic Biol Med.*, 25(1), 33-41,(1998).
- LEVINE S.M. ve WETZEL D.L., In situ chemical analyses from frozen tissue sections by Fourier transform infrared microspectroscopy. Examination of white matter exposed to extravasated blood in the rat brain., *Am J Pathol.*,145(5), 1041–1047, (1994).
- LIQUIER J. ve TAILLANDIER E., Infrared spectroscopy of nucleic acids, *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss, Inc., USA, (1996), pp. 131-158.
- LIN Y., Berg A.H., Iyengar P., Lam T.K., Giacca A., Combs T.P., Rajala M.W., Du X., Rollman B., Li W., Hawkins M., Barzilai N., Rhodes C.J., Fantus I.G., Brownlee M., Scherer P.E., The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species, *J Biol Chem.*, 280(6), 4617-26, (2005).
- LIN S.Y., Li M.J., Cheng W.T., FTIR and Raman vibrational microspectroscopies used for spectral biondiagnosis of human tissues, *Spectroscopy*, 21:1-30, (2007).
- LIU K.Z., Jackson M., Sowa M.G., Haisong J.U., Dixon I.M.C., Mantsch H.H., Modification of the extracellular matrix following myocardial infarction monitored by FTIR spectroscopy, *Biochimi. Biophys. Acta (BBA)- Mol. Basis. Dis.*, 1315:2, 73-77, (1996).
- LIU K.Z., Bose R., Mantsch H.H., Infrared spectroscopic study of diabetic platelets, *Vibrational Spectroscopy*, 28, 131–136, (2002).
- LUNEVA O.G., Brazhe N.A., Maksimova N.V., Rodnenkov O.V., Parshina E.Y., Bryzgalova N.Y., Maksimov G.V., Rubin B., Orlov S.N., Chazov E.I., Ion transport, membrane fluidity and haemoglobin conformation in erythrocyte from patients with cardiovascular diseases: Role of augmented plasma cholesterol. *Pathophysiology*, 14, 41-46, (2007).
- LYMAN D.J., Murray-Wijelath J., Vascular graft healing: I.FTIR analysis of a implant model for studying the healing of a vascular graft, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*, 48, 172-186, (1999).

MACHANN J., Haring H., Schick F., Stumvoll M., Intramyocellular lipids and insulin resistance, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 6:4, 239-248, (2004).

MANTSCH H.H., Biological application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A study of phase transitions in biomembranes, *J. Mol. Structure*, 113, 201-212, (1984).

MCMILLIN J.B., Dowhan W., Cardiolipin and apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1585, 97– 107, (2002).

MELIN A., Perromat A., Deleris G., Pharmacologic application of Fourier transform IR spectroscopy: in vivo toxicity of carbon tetrachloride on rat liver, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 57, 160–168, (2000).

MELIN A.M., Perromat A., Gerard D., Sensitivity of deinococcus radiodurans to γ irradiation: A novel approach by Fourier transform infrared spectroscopy, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394, 265-274, (2001).

MENDELSON R. ve MANTSCH H.H., Fourier transform infrared studies of lipid-protein interaction, *Progress in Protein-Lipid Interactions*, Volume 2, Elsevier Science Publishers, Netherlands, (1986), 103-147.

MEYER C.W., Wagener A., Rink N., Hantschel C., Heldmaier G., Klingenspor M., Brockmann G.A., High energy digestion efficiency and altered lipid metabolism contribute to obesity in BFMI mice, *Obesity (Silver Spring)*, 17:11, 1988-93, (2009).

MEYER T., Bergner N., Bielecki C., Krafft C., Akimov D., Romeike B.F.M., Reichart R., Kalff R., Dietzek B., Popp J., Nonlinear microscopy, infrared, and Raman microspectroscopy for brain tumor analysis, *J Biomed Opt*, 16(2), 021113, (2011).

MINNAARD R., Schrauwen P., Schaart G., Jorgensen J.A., Lenaers E., Mensink M., Hesselink M.K.C., Adipocyte Differentiation-Related Protein and OXPAT in Rat and Human Skeletal Muscle: Involvement in Lipid Accumulation and Type 2 Diabetes Mellitus, *J Clin Endocrinol Metab.*, 94: 4077–4085, (2009).

NGUYEN L.L., Kriketos A.D., Hancock D.P., Caterson I.D., Denyer G.S., Insulin Resistance Does Not Influence Gene Expression in Skeletal Muscle, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 39, 457-463, (2006).

NILSSON M.R., Techniques to study amyloid fibril formation in vitro, *Investigating Protein Folding, Misfolding and Nonnative States: Experimental and Theoretical Methods*, 34:1, 151–160, (2004).

NISSEN-MEYER L.S., Svalheim S., Taubøll E., Gjerstad L., Reinholt F.P., Jemtland R., How can antiepileptic drugs affect bone mass, structure and metabolism? Lessons from animal studies, *Seizure*, 17(2), 187-91, (2008).

NIRANJAN T.G., Krishnakantha T.P., “Membrane changes in rat erythrocyte ghosts on ghee feeding”, *Mol. Cell. Biochem.*, 204, 57–63, (2000).

OAKES N.D., Bell K.S., Furler S.M., Camilleri S., Saha A.K., Ruderman N.B., Chisholm D.J., Kraegen E.W., Diet-induced muscle insulin resistance in rats is ameliorated by acute

dietary lipid withdrawal or a single bout of exercise: parallel relationship between insulin stimulation of glucose uptake and suppression of long-chain fatty acyl-CoA, *Diabetes*, 46, 983-988, (1997).

OLSSON P., Holmback J., Herslof B., Separation of Lipid Classes by HPLC on a Cyanopropyl Column, *Lipids*, no. 47, 93-99, (2011).

OLUSI S.O., Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans, *International Journal of Obesity*, 26, 1159–1164, (2002).

ONO Y., Solomon M. B., Evock-Clover C. M., Steelet N.C., Maruyama K., Effects of Porcine Somatotropin Administration on Porcine Muscles Located Within Different Regions of the Body, *J. Anim. Sci.*, 73: 2282-2288 (1995).

OZEK N.S., Sara Y., Onur R., Severcan F., Low dose Simvastatin induces compositional structural and dynamical changes on rat skeletal extensor digitorum longus muscle tissue, *Bioscience Reports*, 6; 30(1), 41-50, (2009).

OZEK N.S., Tuna S., Erson-Bensan A.E., Severcan F., Characterization of microRNA-125b expression in MCF7 breast cancer cells by ATR-FTIR spectroscopy, *Analyst*, 135(12), 3094-3102, (2010).

PAN D.A., Lillioja S., Kriketos A.D., Milner M.R., Baur L.A., Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action, *Diabetes*, 46(6), 983-8, (1997).

PAN D.A. ve STORLIEN L.H., Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipid fatty acid composition and rate of weight gain in rats, *J Nutr.*, 123(3), 512-9, (1933).

PELTON J.T. ve MCLEAN L.R., Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure, *Analytical Biochemistry*, 277:2, pp. 167-176, (2000).

PERONA J.S. ve RUIZ-GUTIERREZ V., Quantitative Lipid Composition of Iberian Pig Muscle and Adipose Tissue by HPLC, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, no. 28, 2445-2457, (2005).

PERSEGHIN G., Scifo P., De Cobelli F., Pagliato E., Battezzati A., Arcelloni C., Vanzulli A., Testolin G., Pozza G., Del Maschio A., Luzi L., Diabetes, Intramyocellular triglyceride content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ¹H-¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents, *Diabetes*, 48(8), 1600-6, (1999).

PETERSEN K. ve SHULMAN I., Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus, *The American Journal of Cardiology*, 90, 11-18, (2002).

PHILLIPS M.S., Liu Q., Hammond H.A., Dugan V., Hey P.J., Caskey C.J., Hess J.F., Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat, *Nat Genet.*, 13(1), 18–19, (1996).

- PRATS C., Donsmark M., Qvortrup K., Londos C., Sztalryd C., Holm C., Galbo H., Ploug T., Decrease in intramuscular lipid droplets and translocation of HSL in response to muscle contraction and epinephrine, *Journal of Lipid Research*, 47: 2392-2399, (2006).
- PURALI N., Canlı Hücre Görüntüleme Yöntemleri: Hücre Elektrofizyolojisi ve Görüntülemenin Temelleri, Veri Medikal Yayıncılık, İstanbul, (2008), pp. 235-251.
- RAMESH J., Kapelushnik J., Mordehai J., Moser A., Huleihel M., Erukhimovitch V., Novel methodology for the follow-up of acute lymphoblastic leukemia using FTIR microspectroscopy, *Journal of biochemical and biophysical methods*, 51, 251-261, (2002).
- RANDLE P.J., Denton R.M., Concentrations of glycerides and phospholipids in rat heart and gastrocnemius muscles, *Biochem. J.*, 104, 416-422, (1967).
- RASK-MADSEN C. ve KING G.L., Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes, *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3:1, 46-56, (2007).
- RAZANI B., Engelman J.A., Wang X.B., Schubert W., Zhang X.L., Marks C.B., Macaluso F., Russell R.G., Li M., Pestell R.G., Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities, *J. Biol. Chem.*, 276, 38121-38138, (2001).
- REAVEN G.M., Role of Insulin Resistance in Human Disease, *Diabetes*, 37:12, 1595-1607, (1988).
- RESTUCCIA D., Spizziri U.G., Puoci F., Cirillo G., Vinci G., Picci N., Determination of Phospholipids in Food Samples, *Food Reviews International*, 28, 1-46, (2011).
- RIGAS B., Morgellot S., Goldman I.S., Wong P.T.T., Human colorectal cancers display abnormal Fourier-transform infrared spectra, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 8140-8144, (1990).
- RUSSO G.L., Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention, *Biochemical Pharmacology*, 77:6, 937-46, (2009).
- SCHULMAN G.I., Cellular mechanisms of insulin resistance, *J. Clin. Invest.*, 106, 171-176, (2000).
- SETHI J.K. ve HOTAMISLIGIL G.S., The rOLE of Tumor Necrosis Factor Alpha in Adipose Metabolism, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 10(2), 19-29, (1999).
- SEVERCAN F., Vitamin E decreases the order of the phospholipid model membranes in the gel phase: An FTIR study, *Bioscience Reports*, 17, 231-235, (1997).
- SEVERCAN F., Toyran N., Kaptan N., and Turan B., FTIR study of the effect of diabetes on rat liver and heart tissues in the C-H region, *Talanta*, 53, 55-59, (2000).
- SEVERCAN F., Kaptan N., Turan B., FTIR spectroscopic investigation of diabetic rat heart crude membranes, *Spectroscopy, an Int J*, 17, 569-577, (2003).

SEVERCAN M., Severcan F., Haris, I.P., Using artificially generated spectral data to improve protein secondary structure prediction from FTIR spectra of proteins, *Analytical Biochemistry*, 332 (2), 238-244, (2004).

SEVERCAN F., Gorgulu G., Gorgulu T.S., Guray T., Rapid monitoring of Diabetes-Induced Lipid peroxidation by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Analytical Biochemistry*, 339, 36-40, (2005).

SEVERCAN F., Bozkurt O., Gurbanov R., Gorgulu G., FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model, *J. Biophoton.* 3, no 8–9: 621–631, (2010).

SPANDL J., White D.J., Peychl J., Thiele C., Live cell multicolor imaging of lipid droplets with a new dye, LD540, *Traffic*, 10: 1579–1584, (2009).

SHAW C.S., Jones D.A., Wagenmakers A.J.M., Network distribution of mitochondria and lipid droplets in human muscle fibres, *Histochem Cell Biol*, 129:65–72, (2008).

SHAW C.S., Sherlock M., Stewart P.M., Wagenmakers A.J.M., Adipophilin distribution and colocalisation with lipid droplets in skeletal muscle, *Histochem Cell Biol*, 131:575–581, (2009).

SONG X.M., Kawano Y., Krook A., Ryder J.W., Efendic S., Roth R., Walberg-Henriksson H., Zierath J.R., Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats, *Diabetes*, 48, 1-7, (1999).

SPANGENBURG E.E., Pratt S.J.P., Wohlers L.M., Lovering L.M., Methodology report: use of bodipy (493/503) to visualize intramuscular lipid droplets in skeletal muscle, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 598358, doi:10.1155/2011/598358, (2011).

STEPPAN C.M., Bailey S.T., Bhat S., Brown E.J., Banerjee R.R., Wright C.M., Patel H.R., Ahima R.S., Lazar M.A., The hormone resistin links obesity to diabetes, *Nature*, 409(6818), 307-12, (2001).

STORGAARD H., Song X.M., Jensen C.B., Madsbad S., Bjornholm M., Vaag A., Zierath J.R., Insulin signal transduction in skeletal muscle from glucose intolerant relatives of type 2 diabetic patients, *Diabetes*, 50, 2770–2778, (2001).

STORLIEN L.H., Jenkins A.B., Chisholm D.J., Pascoe W.S., Khouri S., Kraegen E.W., Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid, *Diabetes*, 40, 280–9, (1991).

STORLIEN L.H., Hulbert A.J., Else P.L., Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 1 (6): 559-563, (1998).

STUART B., *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. John Wiley and Sons, Ltd., England, (1997).

WANG T.D., Triadafilopoulos G., Crawford J.M., Dickson L.R., Bhandari T., Sahbaie P., Friedland S., Soetikno R., Contag C.H., Detection of endogeneous biomolecules in Barrett's esophagus by Fourier transform infrared spectroscopy, *PNAS*, 104(40): 15864-15869, (2007).

WATTS A. ve DE PONT J.J.H.H.M., Progress in protein-lipid interactions, vol. 2, Amsterdam, (1986), pp. 103-147.

WELLEN K.E. ve HOTAMISLIGIL G.S., Inflammation, Stress, and Diabetes, *J Clin Invest*, 115, 1111-1119, (2005).

WEST P.A., Bostrom P.G., Torzilli P.A., Camacho N.P., Fourier Transform Infrared Spectral analysis of degenerative cartilage: an infrared fiber optic probe and imaging study, *Applied Spectroscopy*, 58(4), 376-381, (2004).

WOLINS N.E., Quaynor B.K., Skinner J.R., Schoenfish M.J., Tzekov A., Bickel P.E., S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes, *J Biol Chem.*, 280: 19146-19155, (2005).

WONG P.T.T., Wong R.K., Caputo T.A., Godwin T.A., Rigas B., Infrared spectroscopy of exfoliated human cervical cells: Evidence of extensive structural changes during carcinogenesis, *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 88: 10988-10992 (1991).

XU H., Barnes T.G., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C.J., Sole J., Nichols A., Ross J.S., Tartaglia L.A., Chen H., Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *J. Clin. Invest.*, 112:1821-1830 (2003).

YANO K., Sakamoto Y., Hirose N., Tonooka S., Katayama H., Kumaido K., Satomi A., Applications of Fourier transform infrared spectroscopy, Fourier transform infrared microscopy and near-infrared spectroscopy to cancer research, *Spectroscopy*, 17(2-3), 315-321, (2003).

ZHANG Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman M.J., Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature*, 372, 425 - 432 (1994).

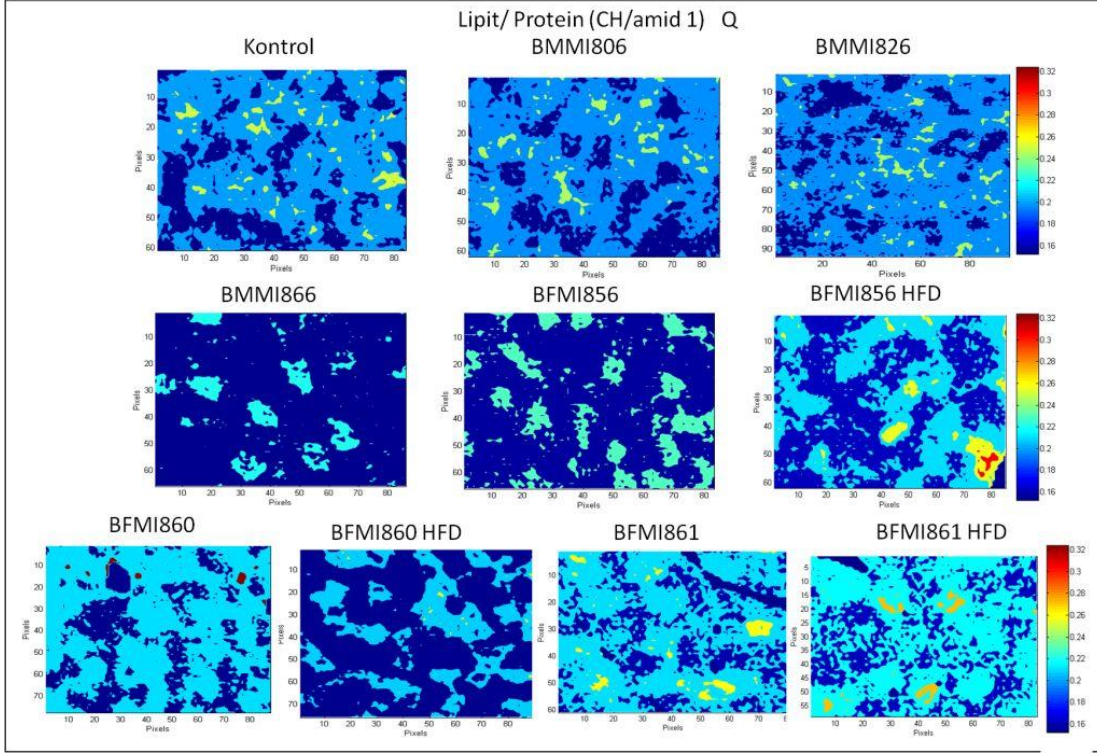
ZHAO B., Wall R.J., Yang J., Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(1), 248-255, (2005).

ZIERATH J.R. ve WALLBERG-HENRIKSSON H., From receptor to effector: insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients, *Ann N Y Acad Sci.*, 967, 120-34 (2002).

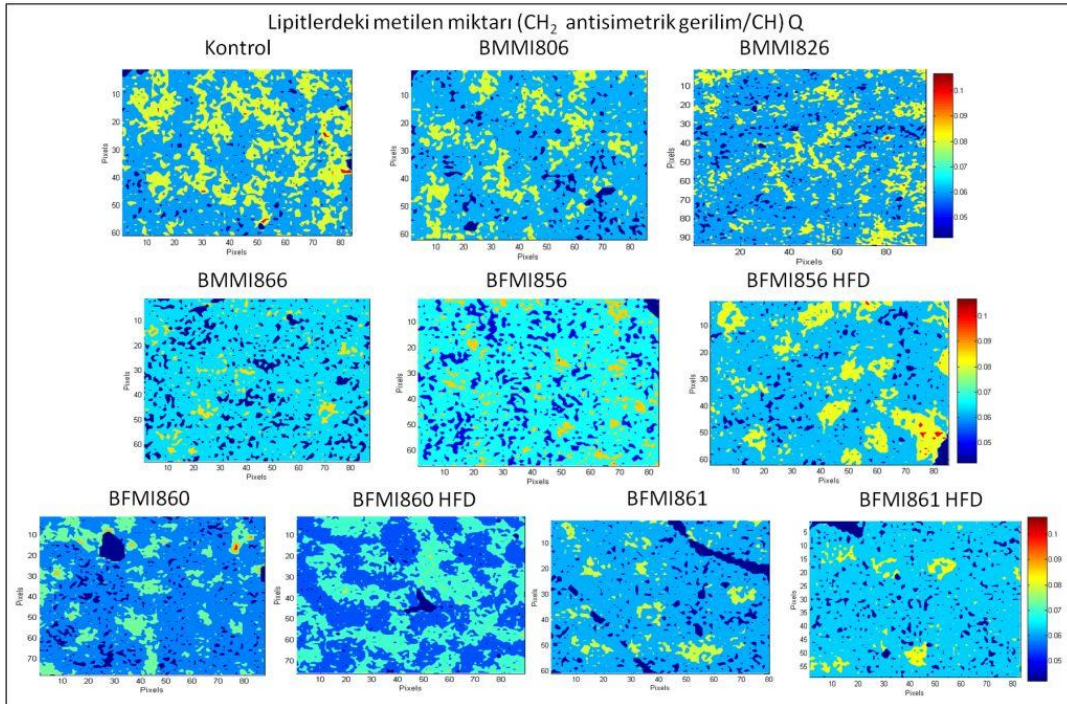
<http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/19182-Optimizing-the-Sensitivity-of-an-Evaporative-Light-Scattering-Detector/>
<http://www.nestgrp.com/pdf/colcare.pdf>

EKLER

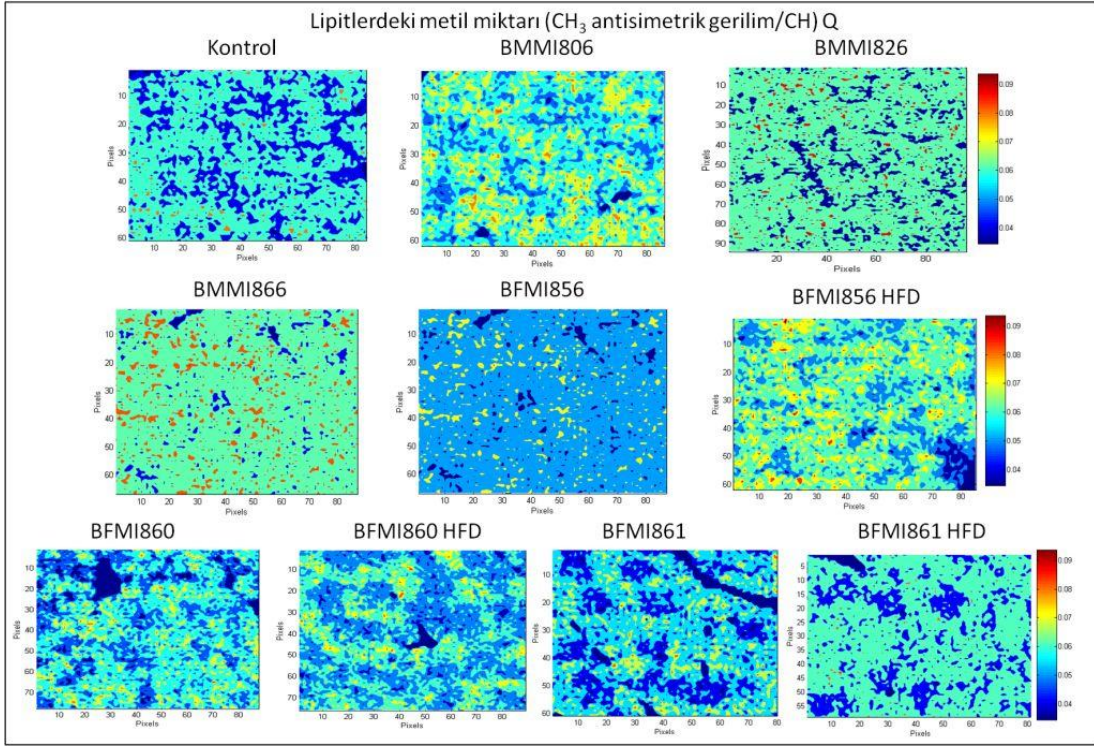
Ek 1. Q kasında biyomoleküllere ait spektral bantların alan oranlarının değişik inbred fare modellerine ait incelenen ırklardaki dağılımı



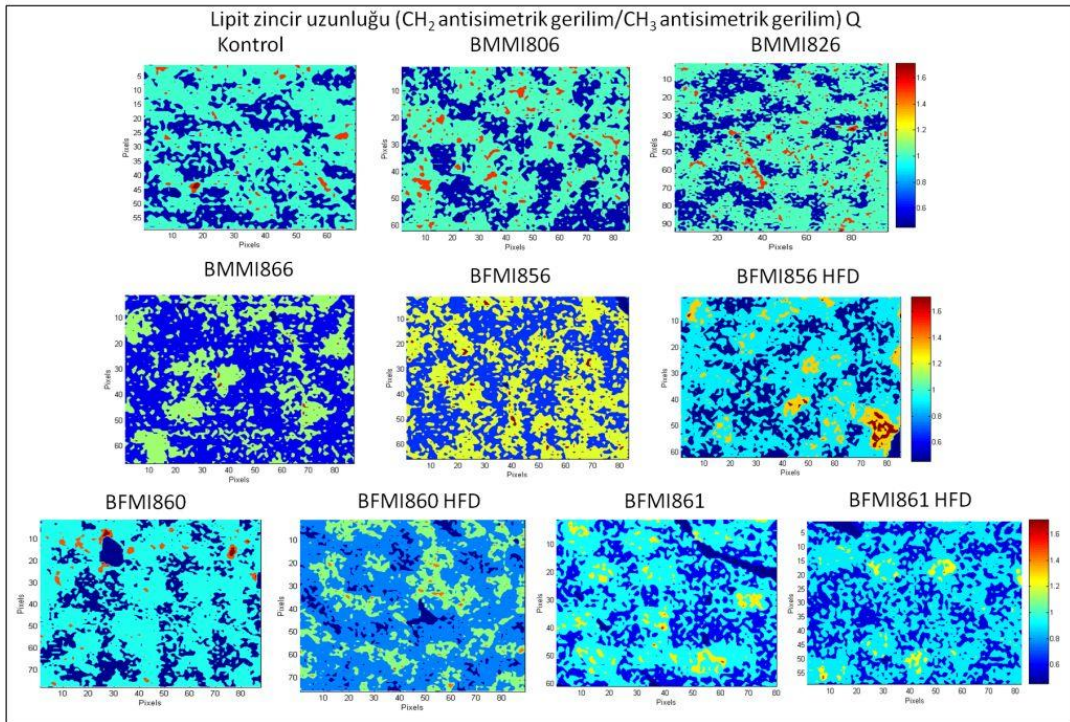
Ek 1 Şekil 1. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları Q kası enine kesitlerindeki lipit/protein değerinin değişimlerini gösteren örnek haritalar



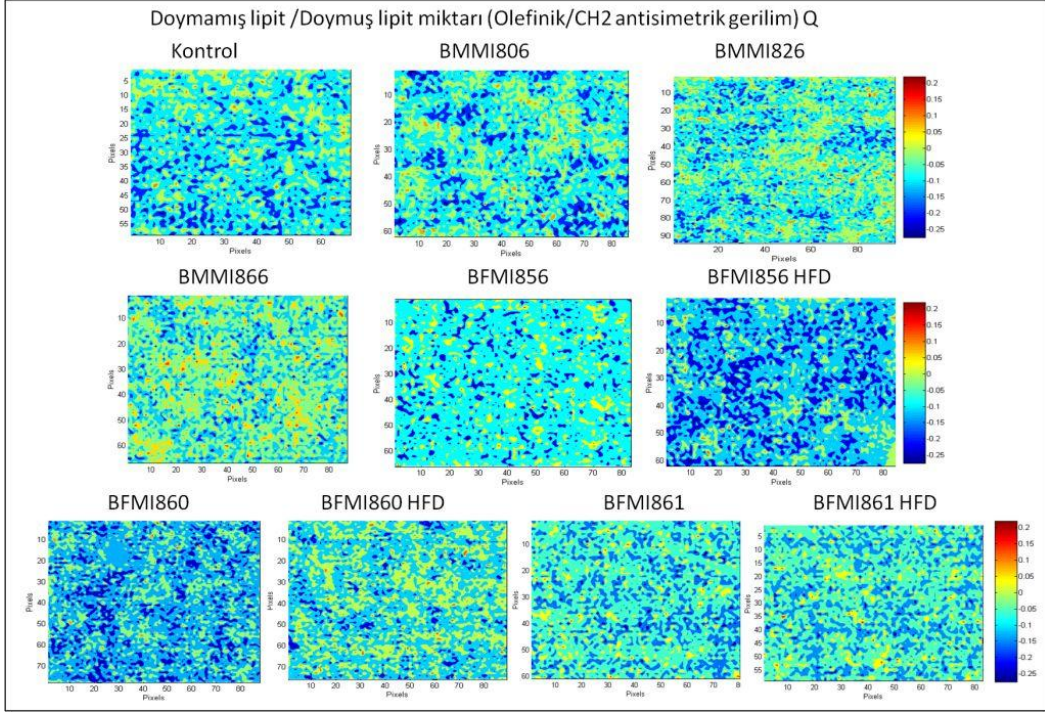
Ek 1 Şekil 2. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları Q kası enine kesitlerindeki CH₂ antisimetrik gerilim bant alanı/CH toplam alanı değerinin değişimlerini gösteren örnek haritalar.



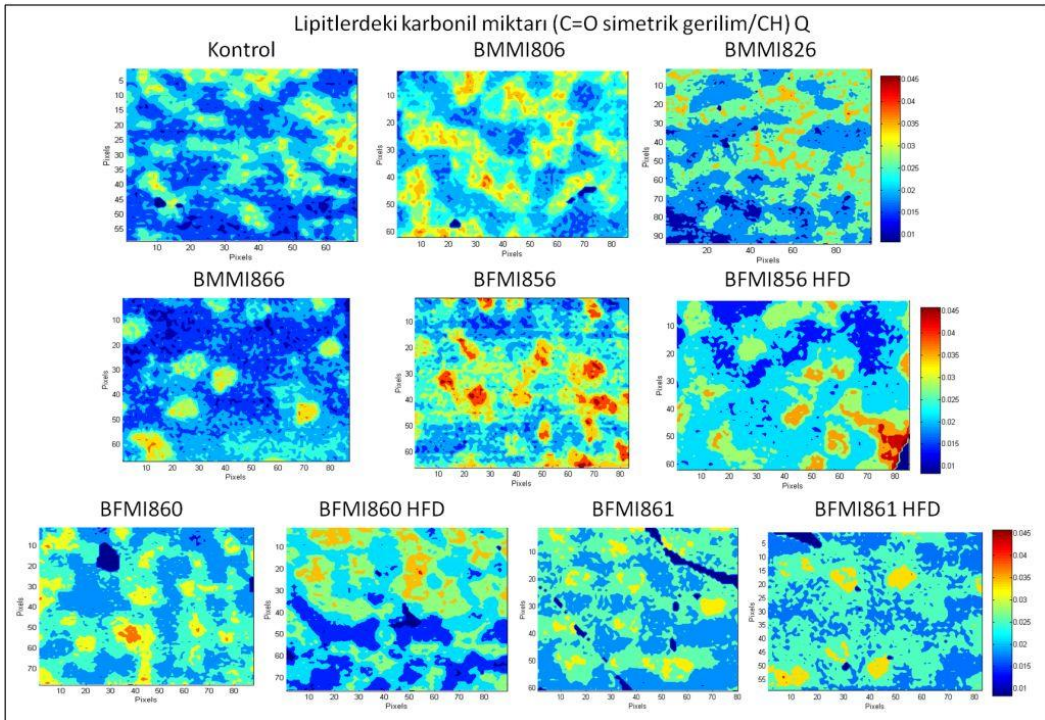
Ek 1 Şekil 3. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları Q kası enine kesitlerindeki CH₃ antisimetrik gerilim bant alanı/CH toplam alanı değerinin değişimlerini gösteren örnek haritalar.



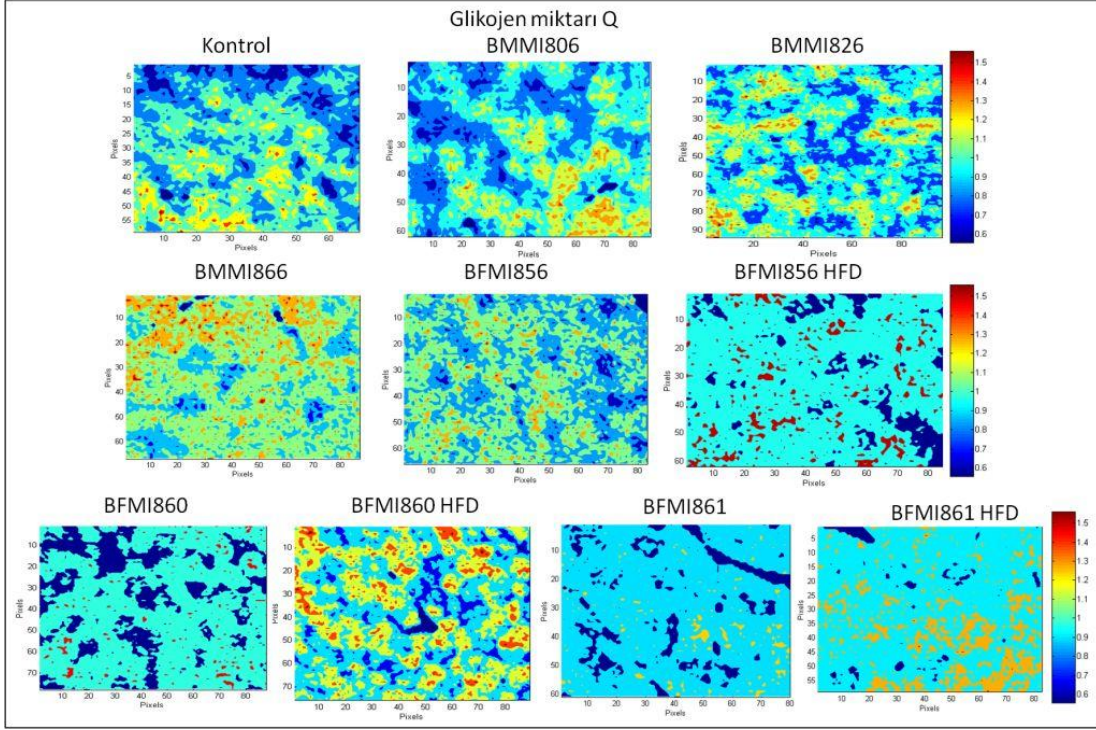
Ek 1 Şekil 4. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları Q kası enine kesitlerindeki CH₂ antisimetrik gerilim bant alanı/CH₃ antisimetrik gerilim bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.



Ek 1 Şekil 5. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları Q kası enine kesitlerindeki olefinik bant alanı/ CH₂ antisimetrik bant alanı parametresindeki değişimleri gösteren örnek haritalar.



Ek 1 Şekil 6. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları Q kası enine kesitlerindeki C=O ester bant alanı/ CH toplam alanı oranı değişimlerini gösteren örnek haritalar.



Ek 1 Şekil 7. SBD ile beslenmiş kontrol (DBA/2J), BMMI ve BFMI ırkları ile HFD ile beslenmiş BFMI ırkları Q kası enine kesitlerindeki glikojen miktarı değişimlerini gösteren örnek haritalar.



**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: SBAG-BMBF-6 (108S264)
Proje Başlığı: KAS ÖZELLİKLERİ VE OBEZİTE ARASINDAKİ İLİŞKİNİN GENETİK VE BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof. Dr. Feride SEVERCAN Prof. Dr. Nuhan PURALI Yard. Doç. Dr. Sreeparna BANERJEE
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, İnönü Bulvarı, 06531, Çankaya, Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Nisan 2009- Nisan 2012
Öz (en çok 70 kelime) Bu çalışmada, karmaşık genetik yapıya ve kendiliğinden gelişen obeziteye sahip inbred BMMI ve BFMI fareleri LD ve Q kasları incelenerek bu fareler karakterize edilmiş, BMMI 806 ve BFMI860 ırklarının daha yüksek lipid içeriğine sahip olduğu ve bu ırkların obezite çalışmalarına daha uygun oldukları belirlenmiştir. HFD verilen BFMI gruplarının analizi, diyetin obezite gelişiminde en az genetik faktörler kadar önemli olduğunu göstermiştir. Ayrıca, LD kasının Q kasından daha fazla etkilendiği anlaşılmıştır.
Anahtar Kelimeler: Obezite, iskelet kası, insülin direnci, fare modeli, ATR-FTIR spektroskopisi, FTIR mikrospektroskopisi, konfokal mikroskopisi, HPLC
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: Proje dahilinde yapılan deney sonuçlarını içerecek yayınların orijinalliğini korumak ve SCI'de etki faktörü yüksek dergilerde yayınlarımızı yapabilmek amacıyla sonuçların yayına gönderilmesi için tüm çalışmaların tamamlanması beklenmiştir. Proje dahilinde tamamlanan çalışmalardan standart beslenme diyeti ile beslenmiş BFMI fareleri iskelet

kaslarının ATR-FTIR spektroskopik tekniği ve HPLC ile incelenmesi sonuçlarını içeren kısım yayına hazırdır ve önümüzdeki haftalar içerisinde International Journal of Obesity (etki faktörü 5.1) dergisine gönderilecektir.

Bundan başka proje dahilinde gerçekleştirilen diğer görüntüleme çalışmaları, HPLC ile geliştirilen metodu kapsayan çalışmamız ve HFD ile beslenmiş farelere ait çalışmalar olmak üzere 3 adet yayın hazırlığı da başlamıştır.

Proje dahilinde yapılan çalışmalar aşağıdaya belirtilen kongrelerde sunulmuştur.

Kongre yayınları:

1. Aras E., Brockmann A.G., Severcan F., HPLC-ELSD ile Berlin obez inbred (BFMI) ve Berlin kas inbred (BMMI) fare modellerinde, longissimus dorsi ve kuadriseps kas dokularındaki lipit profilinin, obezite ile olan ilişkisinin nitel ve nicel olarak belirlenmesi, Kromatografi2012 Kongresi, 6-9 Haziran 2012, Tokat, Türkiye.
2. Bozkurt O., Shaw C.S., Heise S., Brockmann A.G., Severcan F., Fiber type specific distribution of lipid droplets in skeletal muscles of inbred Berlin fat mice (BFMI) lines, LIPID MAPS Annual Meeting 2012, Lipidomics Impact on Cell Biology, Metabolomics and Translational Medicine, Mayıs 7-8, 2012, La Jolla, A.B.D., Özet kitabı, sayfa 78.
3. Sen I., Bozkurt O., Heise S., Brockmann A.G., Severcan F., Effect of obesity on lipids in adipose and skeletal muscle tissues in inbred obese mouse models: A novel ATR-FTIR study, LIPID MAPS Annual Meeting 2012, Lipidomics Impact on Cell Biology, Metabolomics and Translational Medicine, Mayıs 7-8, 2012, La Jolla, A.B.D., Özet kitabı, sayfa: 78.
4. Bozkurt O., Heise S., Brockmann A.G., Severcan F., “FTIR microspectroscopic imaging of skeletal muscles of BFMI mice”, Sözlü sunum, 3rd International Workshop on Molecular Approaches to Obesity and Diabetes with New Implications, 15-16 Mart, 2012, ODTÜ, Ankara, Çalıştay özet kitabı, sayfa 11.
5. Aras E., Heise S., Brockmann A.G., Severcan F., Characterization and quantification of lipid profiles in longissimus dorsi and quadriceps muscle tissues of Berlin fat and muscle mouse models by HPLC-ELSD, Poster sunum, 3rd International Workshop on Molecular Approaches to Obesity and Diabetes with

New Implications, 15-16 Mart, 2012, ODTÜ, Ankara, Ç Çalıştay özet kitabı, sayfa 19.

6. Bozkurt O., Heise S., Brockmann A.G., Severcan F., Berlin inbred obez fare ırkları iskelet kası makromoleküler özelliklerinin ATR-FTIR spektroskopisi ve yapay sinir ağları ile karakterizasyonu, 22. Ulusal Biyofizik Kongresi, 28 Eylül-1 Kasım, 2010, Aydın, Özet kitabı, sayfa: 45.
7. Bozkurt O., Heise S., Brockmann A.G., Severcan F., Structural and functional characterization of macromolecules in skeletal muscles of inbred mice lines: An ATR-FTIR spectroscopic study, SPEC2010 “Shedding Light on Disease: Diagnostic Applications for the New Millennium”, 26 Haziran- 1 Temmuz 2010, Manchester, İngiltere, Özet kitabı, sayfa: 219.
8. Bozkurt O., Brockmann G., Severcan F., Characterization of lipids in skeletal muscles of inbred mice lines: An ATR-FTIR spectroscopic study, FEBS/IUMB Workshop Eukaryotic lipids; treasure of regulatory information, 19-24 Haziran, 2010, Spetses, Yunanistan, Poster özet kitabı, sayfa: 14.
9. Bozkurt O., Heise S., Brockmann A.G., Severcan F., ATR-FTIR spectroscopic characterization of muscles in inbred mice, 2nd International Workshop on Molecular Approaches to Obesity with New Implications, 04 Haziran, 2010, Berlin, Almanya.
10. Bozkurt O., Brockmann G., Severcan F., “ATR-FTIR Spectroscopy Reveals the Different Characteristics of Lipids in Longissimus Dorsi Muscles of Inbred Mice Lines”, 2nd International Biophysics Congress and Biotechnology at GAP & 21st National Biophysics Congress, 5-9 Ekim 2009, Diyarbakır, Poster no 80, Özet kitabı, sayfa: 106-107.
11. Bozkurt O, Çakmak G, Garip S., Severcan F., “Implications of FTIR Microspectroscopy in Pathological Conditions”, Sözlü sunum, International Workshop on Molecular Approaches to Obesity with New Implications, 12 Haziran, 2009, ODTÜ, Ankara.
12. Severcan F., A Novel Molecular Approach in metabolic diseases : FTIR Spectroscopy, Sözlü sunum, International Workshop on Molecular Approaches to Obesity with New Implications, 12 Haziran, 2009, ODTÜ, Ankara.

Diğer Aktiviteler:

Proje bünyesinde Ankara’da iki çalıştay düzenlenmiştir. Bu çalıştaylardan ilki 12 Haziran 2009 tarihinde, ikincisi ise 15-16 Mart 2012 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir. İkinci çalıştay 58 kişinin katılımı ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalıştaya yurt dışından proje grubu harici, konularında çok tanınmış 3 değerli bilim insanı kendi imkanları ile katılmış ve konuşma yapmıştır. Ayrıca ekte programın da görüleceği üzere, Türkiye’den de tanınmış bilim insanları konuşma yapmıştır. Bu çalıştaya katılan katılımcıların imzaladığı katılım listesi sonuç raporuna eklenerek kurumunuza iletilmektedir. İlk çalıştaya katılan katılımcıların imzaladığı liste birinci dönem gelişme raporunda kurumunuza iletilmiştir.

Ekte Bulunan “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”, “Kazanımlar” Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarınızın Başarı Öyküsü Niteliği Taşındığını Düşünüyorsanız “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”nu doldurunuz.

1. Proje yürütücüsü iletişim bilgileri:

Adı – Soyadı : Feride SEVERCAN
Unvanı : Prof. Dr.
Telefon : (312) 210 51 66
E-posta adresi : feride@metu.edu.tr