



T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞI OBEZİTESİNDE *HIF3A* VE *IL-6*
GENLERİ İLE *miR-130b* VE *miR-146b*'DEKİ EPİGENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Esra TEKCAN

Samsun

Ocak-2020



T.C.

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇOCUKLUK ÇAĞI OBEZİTESİNDE *HIF3A* VE *IL-6*
GENLERİ İLE *miR-130b* VE *miR-146b*'DEKİ EPİGENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Esra TEKCAN

Danışman

Prof. Dr. Nurten KARA

Samsun

Ocak-2020

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Esra TEKCAN tarafından Prof. Dr. Nurten KARA danışmanlığında hazırlanan ‘Çocukluk çağı obezitesinde *HIF3A* ve *IL-6* genleri ile *miR-130b* ve *miR-146b*’deki epigenetik değişikliklerin incelenmesi’ başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 23/01/2020 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :Prof. Dr. H. Murat AYDIN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Nurten KARA, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye :Doç.Dr. Nevin KARAKUŞ, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi



Üye :Doç.Dr. Akın TEKCAN, Amasya Üniversitesi



Üye :Dr.Öğr. Üyesi M. Alper ARSLAN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

/ /

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgisini, yardımını, desteğini, ilgi ve anlayışını hiç eksik etmeyen, birlikte çalışmaktan onur, gurur ve mutluluk duyduğum tez danışmanım sayın Prof. Dr. Nurten KARA'ya, Doktora eğitimime katkılarından dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet ELBİSTAN'a, Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e ve Dr. Öğr. Üyesi M. Alper ARSLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince yardımlarını, anlayış ve ilgisini esirgemeyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Endokrinoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. H. Murat AYDIN'a yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamıza kattığı destek ve yardımlarından dolayı Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Dr. Öğr. Üyesi Ümmet ABUR'a ve Doktora öğrencisi Mohsin ABBASZADEH'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca yardımını esirgemeyen Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi değerli arkadaşım Z. Betül ÇELİK'e ve tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, doktora eğitimim boyunca desteklerini hep hissettiğim değerli mesai arkadaşlarım Sevinç Kılınçarslan, Oktan Erboğa ve Fatma Çavaş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan değerli ablam Doç.Dr. Şengül TURAL'a , değerli abim Dr. Öğr. Üyesi Ercan TURAL'a, hayatımın her alanında destek ve fedakarlığını hiç eksik etmeyen sevgili Annem'e, anlayış ve desteği için eşim Alper Tekcan'a, varlığıyla en büyük motivasyon kaynağım olan biricik kızım Zeynep Melis'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, PYO.TIP. 1904.18.003 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

ÇOCUKLUK ÇAĞI OBEZİTESİNDE *HIF3A* VE *IL-6* GENLERİ İLE *miR-130b* VE *miR-146b*’ DEKİ EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Amaç: Çalışmamızda, obez ve kontrol grubunu oluşturan çocuklar arasında, *HIF3A* ve *IL-6* genleri promotör bölgelerinde, obeziteye neden olabilecek metilasyon farklılıklarının gözlenmesi ve *hsa-miR-130b* ve *hsa-miR-146b*’nin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Materyal ve Metot: Obezite tanısı konulan 49 obez (obez n=49) çocuk ile 49 sağlıklı kontrol (n=49) çocuktan oluşan iki grup oluşturuldu. Tüm örneklerin periferik kan lökositlerinden elde edilen genomik DNA’larındaki *IL-6* ve *HIF3A* genlerinin promotör metilasyon profilleri metilasyona spesifik PCR yöntemiyle analiz edildi. On beş obez çocukta *hsa-miR-130b* ve *hsa-miR-146b*’nin ekspresyon düzeylerini belirlemek için kantitatif real-time PZR yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Obez çocuklarda *IL-6* geni promotör bölgesi için metilasyon sıklığı % 93,9 (46/49) kontrol grubunda metilasyon sıklığı % 100 (49/49) olarak bulundu. *HIF3A* geninde ise obez ve kontrol grubuna ait DNA örneklerinde metilasyon gözlenmedi. Obez ve kontrol grubu arasında *IL-6* ve *HIF3A* geni metilasyon düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Obez grubunda *hsa-miR-130b* ve *hsa-miR-146b*’de ekspresyon düzeyleri sağlıklı kontrol gruba göre yüksek bulundu (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.001$).

Sonuç: Obez grupta *IL-6* ve *HIF3A* genlerinde kontrole göre metilasyon farklılığı bulunmamıştır. Buna karşın obez grupta kontrole göre *hsa-miR-130b* ile *hsa-miR-146b*’nin ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Bunlar obezitenin tedavi ve önlenmesinde kullanılabilecek biyobelirteçler olabilir. Bu biyobelirteçlerin analizinin periferik kan örneklerinden yapılması kolay uygulanabilecek bir yöntemdir.

Anahtar Kelimeler: DNA metilasyonu; epigenetik; mikroRNA; obezite

Esra TEKCAN, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Ocak- 2020

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EPIGENETIC CHANGES IN *HIF3A* AND *IL-6* GENES WITH *miR-130B* AND *miR-146B* IN CHILDHOOD OBESITY

Aim: In our study, it was aimed to investigate the methylation differences in the promotor regions of *HIF3A* and *IL-6* genes that may cause obesity and to compare the expression levels of *hsa-miR-130b* and *hsa-miR-146b* between the obese and control groups.

Material and Method: The study group consisted of 49 children diagnosed with obese and 48 healthy, non obese controls. Promoter methylation of *HIF3A* and *IL-6* was analyzed by methylation-specific PCR. Expression levels of *hsa-miR-130b* and *hsa-miR-146b* in 15 obese children and healthy control were determined by quantitative Real Time PCR.

Results: Methylation of *IL-6* gene in obese children was 93.9% (46/49) and 100% (49/49) in control group. There was no methylation of *HIF3A* gene in obese and control groups. No statistically significant difference was found between the obese and control groups when the promoter region methylations for *IL-6* and *HIF3A* genes were compared ($p>0.05$). Expression levels in *hsa-miR-130b* and *hsa-miR-146b* were higher in the obese group than in the control group ($p<0.01$, $p<0.001$, respectively).

Conclusion: There was no difference in methylation of *IL-6* and *HIF3A* genes in obese group compared to control group. However, there was a significant increase in the expression levels of *hsa-miR-130b* and *hsa-miR-146b* in the obese group. These may be biomarkers that can be used in the treatment and prevention of obesity. Analysis of these biomarkers from peripheral blood samples may be an easy method.

Keywords: DNA methylation; epigenetic; microRNA; obesity

Esra TEKCAN, Ph. D. Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, January-2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGO-2:	Argonaute 2
ALT:	Alanin aminotransferaz
AST:	Aspartat aminotransferaz
BMP:	Kemik morfojenetik protein
C / EBP:	CCAAT / arttırıcı bağlayıcı proteinler
cmiRNA:	Dolaşımdaki miRNA'lar
CpG:	Sitozin fosfat Guanin
DGCR8:	DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8
DNMT:	DNA metil transferaz
DSÖ:	Dünya sağlık örgütü
6-FAM:	6-karboksifloresin
FTO:	Yağ kütlesi ve obezite ile ilişkili gen
HAT:	Histon asetil transferaz
HDAC:	Histon deasetilaz
HDL:	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HDF:	Yüksek yağlı diyet
HIF3A:	Hipoksi indükleyici faktör 3 alfa
Homa-IR:	Homeostatic Model of Assessment-Insulin Resistance
IGF-1:	İnsülin-benzeri büyüme faktörü-1

IL-6:	İnterlökin 6
IncRNA:	Uzun kodlamayan RNA
IRAK:	İnterlökin-1 reseptör-ilışkili kinaz
IRS:	İnsülin reseptör substrat
LDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
M:	Metile
MC4R:	Melanokortin 4 resptörü
miRNA:	Mikro RNA
mRNA:	Mesajcı RNA
MSP:	Metilasyon profiline özgün olan primer
MS-PZR :	Metilasyona spesifik polimeraz zincir reaksiyonu
NF kB:	Nükleer Faktör kappa B
NPM-1:	Nükleofosmin-1
PBMC:	Periferal kan mononüklear hücre
PDGF:	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PPAR :	Peroksizom proliferatör-aktif reseptör
Pre-miRNA:	Prekürsör miRNA
Pri-miRNA:	Primer miRNA
P13K:	Fosfotidil inositol 3-kinaz
POMC:	Proopimelanokortin geni
qRT-PZR:	Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

RBP4:	Retinol bağlayıcı protein 4
RISC:	RNA- indükleyici baskılama kompleksi
SAD:	Subkutan adipoz doku
SAM:	S-Adenozil Metiyonin
SO₃⁻ :	Sülfonat
SREBP1:	Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein
TAMRA:	6- karboksitetrametil-rodamin
TD2:	Tip 2 diabet
TFAM:	Transkripsiyon faktör A, mitokondriyel gen
TGF-β:	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TNF-α:	Tümör nekroz faktör alfa
TRIM 3:	Tripartit motif protein 3
U:	Unmetile
UBASH3A:	Ubikitin ilişkili SH3 domain A içeren gen
USP:	Metilasyon profiline özgün olmayan primer
3'UTR:	Translasyona uğramayan 3' bölgesi
XPO5:	Exportin 5
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VKİ:	Vücut kitle indeksi

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Obezite Nedir?	3
2.2. Obezitenin Neden Olduğu Hastalıklar	3
2.3. Dünya Geneline Obezitenin Görülme Sıklığı	7
2.4. Çocukluk Çağı Obezitesi	8
2.5. Obezitenin Hesaplanması	8
2.6. Obezite Genetiği.....	9
2.7. Epigenetik ve Obezite	13
2.7.1. DNA Metilasyonu	14
2.7.2. Histon Modifikasyonları.....	24
2.7.3. Mikro RNA.....	26
2.7.4. Long-noncoding RNA'lar (lncRNA)	33
2.8. Obezite Tedavi Yöntemleri	34
2.9. Obezitede Gen Terapisi.....	36
3. MATERYAL VE METOT	40
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	40
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Teknik Malzemeler	41
3.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması.....	42
3.4. Kan Örneklerinin Toplanması.....	42
3.4.1. Kandan DNA İzolasyonu	42
3.4.2. DNA miktarının Tayini	43
3.4.3. Bisülfid Modifikasyon Yöntemi	43
3.4.4. Metilasyon Spesifik PZR (MS-PZR)	45
3.4.5. Agaroz Jel Elektrophorezi	49
3.4.6. Kandan Mikro RNA İzolasyonu	49
3.4.7. Revers Transkripsiyon ile cDNA Sentezi	51

3.4.8. Eş Zamanlı PZR (qRT-PCR) Yöntemi	53
3.4.9. <i>Hsa-miR-146b-5p</i> ve <i>hsa-miR-130b-5p</i> İfade Düzeylerinin Ölçümü	54
3.5. İstatistiksel Analizler.....	56
4. BULGULAR	57
4.1. Obez ve Kontrol Grubu Demografik ve Klinik Özellikleri	57
4.2. <i>HIF3A</i> ve <i>IL-6</i> Genleri Promotor Metilasyon Analizi Sonuçları	59
4.3. <i>Hsa-miR-130b</i> ve <i>hsa-miR-146b</i> qRT-PCR Analiz Sonuçları	64
5. TARTIŞMA	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	78
EKLER	96
ÖZ GEÇMİŞ	104

1. GİRİŞ

Obezite, besinler yoluyla alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması sonucu, yağlı vücut kitlesinin yağsız vücut kitlesine oranına artması ile ortaya çıkan ciddi kronik bir hastalıktır (Başara, 2015). Başta kardiovasküler, endokrin sistem, kanser olmak üzere, vücudun tüm organ ve sistemlerini etkileyerek çeşitli bozukluklara ve hatta ölümlere yol açabilen önemli bir sağlık problemidir (Başara, 2015).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2015 verilerine göre; obezite sıklığı dünya genelinde 600 milyondan fazladır (WHO, 2015). Obezite sıklığı gittikçe artmaktadır ve 2030 yılına kadar dünya nüfusunun yaklaşık %58'inde obezite görülmesi beklenmektedir (Güçlü-Geyik ve Erginel-Ünaltuna, 2013).

Yapılan çalışmalar, yaklaşık 43 milyon okul öncesi çocuğun aşırı kilolu ya da obez olduğunu bildirmektedir. 1990 yılından 2010 yılına kadar bu sayı %60 artış göstermiştir (Huang ve ark., 2015). Son 25 yılda ise bebekler ve 5 yaşına kadar olan küçük çocuklarda katlanarak artmıştır. Dünya genelinde 1990'da 32 milyon olan obez çocuk sayısı, 2013'te 42 milyona yükselmiş olup, obezite son dönemlerde çocuklar arasında küresel olarak en yaygın beslenme bozukluğu olarak dikkati çekmektedir (Cerdo ve ark., 2019). Obez çocuklar, ileriki yaşamlarında birçok hastalık için yüksek risk taşımaktadırlar (Huang ve ark., 2015). Obezite, kalp-damar hastalıkları, yüksek tansiyon, şeker hastalığı, bazı kanser türleri, solunum sistemi hastalıkları, kas-iskelet sistemi hastalıkları gibi pek çok sağlık probleminin oluşmasına zemin hazırlamakta ve hayat kalitesi ve süresini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu sebeple obezite ile mücadele gerçekte pek çok hastalıkla mücadele demektir ve obezite için özgül biyobelirteçlerin tespit edilmesi, tedavi ve önlenmesinde etkili olacaktır. Obezitenin kısa bir sürede bu kadar hızlı artışı sadece genetik faktörlerle açıklanamamaktadır. Diyet ve fiziksel aktivite düzeyi gibi çevresel faktörler de obezite insidansının günümüzde önem arz eden hızdaki artışında önemli rol oynamaktadır (Huang ve ark., 2015). Bununla birlikte, teknolojinin hızlı ilerlemesiyle ortaya çıkan yenilikler insanlığın hizmetine sunulmakta ve gün geçtikçe değişen bir hayat tarzı bu sürece katkı sağlamaktadır.

Obeziteye duyarlılıkta, bireyler arası farklılıkların epigenetik faktörlere bağlı olduğu görüşü öne çıkmaktadır (Campion ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda da obez bireyler ile sağlıklı normal kilolu bireyler arasında epigenetik mekanizmalardan olan

metilasyon profili ve mikro RNA (miRNA) ekspresyonları bakımından farklılıklar gözlenmiştir (Dick, 2014).

Obezitede adiposit dokunun büyümesiyle adipositlere giden kan miktarının azalması neticesinde hipoksi meydana gelmektedir. Hipoksi indükleyici faktör 3A (*HIF3A*) geninin metilasyonunun vücut kitle indeksi (VKİ) ve adipozite ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (Wang ve ark., 2015). Obezitenin düşük derecede kronik inflamasyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir ve obezlerde interlökin-6 (IL-6) düzeylerinde artış gözlenmiştir (Koyuer, 2005; Cerdo ve ark., 2019).

MiRNA'lar adipoz doku farklılaşması, proliferasyonu, glukoz ve lipid metabolizmasında rol alır (Mcgregor ve Choi, 2011). Obezite ile ilgili miRNA'lar obeziteye karşı geliştirilen ilaçlar için yeni tedavi yöntemleri sağlamaktadır (Mcgregor ve Choi, 2011).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, obez çocuklarda *HIF3A*, *IL-6* genlerinin promotor bölge metilasyon düzeylerinin ve *hsa-miR-130b*, *hsa-miR-146b*'in ekspresyon düzeylerinin obezitede bir rolü olup olmadığının araştırılmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obezite Nedir?

Obezite yağlı vücut kitlesinin yağsız vücut kitlesine oranla artması durumudur (Altunkaynak ve Özbek, 2006). Multifaktöriyel patogenezi olan obezite sağlıksız yaşam tarzı, nöronal ve hormonal mekanizmalar, genetik ve epigenetik faktörler nedeniyle meydana gelen tedavi edilmesi gereken küresel pandemik kompleks bir hastalıktır (Cerdo ve ark., 2019). Sağlığa zararlı olabilecek anormal veya aşırı yağ birikimi olarak da tanımlanır (Cerdo ve ark., 2019). Obezite, genellikle viseral yağ olmak üzere yağ kütlesi birikimi ile karakterize, dünya çapında bir epidemiyolojik sendromdur (Cerdo ve ark., 2019).

2.2. Obezitenin Neden Olduğu Hastalıklar

Obezite, tip II diyabet (T2D), hipertansiyon, hiperlipidemi, kardiyovasküler hastalıklar, insülin direnci, inme, uyku apnesi, erkeklerde kolon, rektum, prostat, kadınlarda endometriyum, meme ve safra kesesi kanseri gibi morbidite ve mortalitesi yüksek birçok sağlık sorununa neden olmaktadır (Annagür, 2010; Kalan ve Yeşil, 2010, Tablo 1).

Tablo 1: Obezitenin neden olduğu hastalıklar (Kalan ve Yeşil, 2010)

1. Metabolik-hormonal komplikasyonlar	➤ Karaciğer Hastalığı
➤ Metabolik sendrom	➤ Gastroözofajiyal Reflü Hastalığı
➤ Tip 2 diyabet	5. Polikistik Over Sendromu
➤ İnsülin direnci, hiperinsülinemi	6. İmmün sistem disfonksiyonu
➤ Dislipidemi	7. Cilt hastalıkları
➤ Hipertansiyon	8. Cerrahi komplikasyonlar
2. Kardiyovasküler sistem hastalıkları	9. Kanser
➤ Serebrovasküler hastalık	➤ Kolon
➤ Konjestif kalp yetersizliği	➤ Dişi üreme: serviks, endometrium, over
➤ Koroner kalp hastalığı	➤ Safra kesesi
➤ Hipertansiyon	➤ Prostat
➤ Tromboembolik hastalık	➤ Meme
3. Solunum sistemi hastalıkları	10. Obezitenin mekanik komplikasyonları
➤ Obezite-hipoventilasyon sendromu	➤ Osteoartrit
➤ Uyku apne	➤ Artmış karın içi basıncı, herni
4. Sindirim Sistemi Hastalıkları	11. Psiko-sosyal komplikasyonlar
➤ Safra kesesi hastalığı	

DSÖ tarafından günümüzde küresel bir salgın olarak ilan edilmektedir (Cerdo ve ark., 2019). Ayrıca obezite, kardiyovasküler patolojiler veya diyabet gibi diyetle ilişkili kronik hastalıklarda ve aynı zamanda inflamatuvar ve alerjik bozukluklarda da etken olmaktadır (Cerdo ve ark., 2019). Yüksek VKİ, hipertansiyon, dislipidemi, TD2, kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik sendrom gibi kronik hastalıklar ve aynı zamanda bazı kanser türlerinin gelişmesiyle ilişkilidir (Cerdo ve ark., 2019). Kanser tedavisinin etkinliğinde düşmeye, kötüye giden prognoza ve mortalitede artışa sebep olabilmektedir (Urhan ve Akbulut, 2017). Kanser ölümlerinin kadınlarda %20'sinin, erkeklerde %14'ünün obeziteyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Urhan ve Akbulut,

2017). Yağın, özellikle karın boşluğunda fazla birikmesi, insülin direnci ve T2D gibi glukoz intoleransına neden olan çeşitli bozuklukların başlangıcı, artmış trigliserid, düşük HDL (yüksek dansiteli lipoprotein) kolesterol (dislipidemi), yüksek tansiyon, proinflamatuvar ve protrombotik durumların aktivasyonu ile ilişkilidir (Gözel ve Kılınç, 2018). Metabolik sendrom olarak tanımlanan obezite komplikasyonları, kardiyovasküler hastalık riskini artırmaktadır (Gözel ve Kılınç, 2018). Son yıllarda, obezitenin erişkinlerin yanı sıra gelişim çağındaki çocuklarda da görülme sıklığı artmıştır (Gözel ve Kılınç, 2018). Ortaya çıkan kanıtlar, beslenme alışkanlıklarının, yüksek şekerli ve doymuş yağın, aynı zamanda obezite ile ilişki gösteren anksiyete ve duygudurum bozukluklarına katkıda bulunduğunu göstermektedir (Cerdo ve ark., 2019).

Obezite probleminin merkezinde, metabolik homeostazda sistemik etki gösteren adipokinlerin salgılanması ve fazla enerjinin trigliseritler olarak depolanması ile ikili bir rol oynayan adipositler vardır (Lo ve ark., 2018).

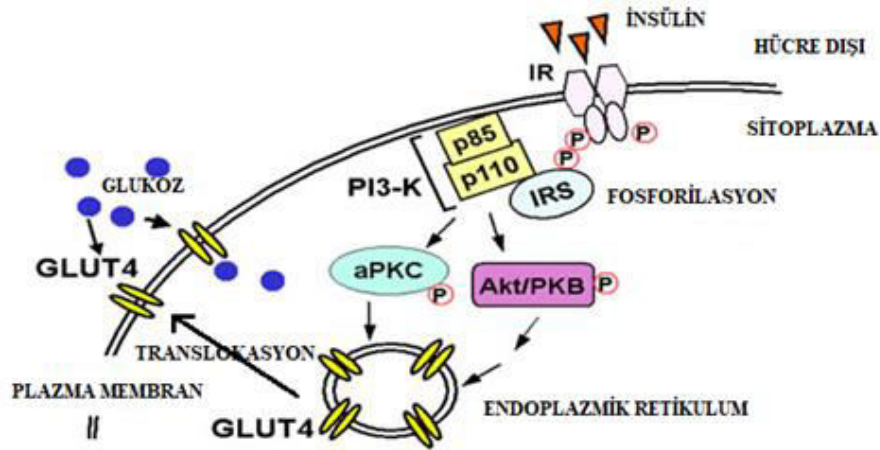
Obezite sonucu oluşan hormonal ve metabolik değişiklikler kansere neden olan faktörlerin artışına neden olmaktadır. Obezlerde adiposit hücrelerinden salınan çeşitli hormonlar ve büyüme faktörlerinin fazla miktarlarda ve sürekli olması, hücreleri daha fazla büyümeleri ve bölünmeleri için uyarmakta böylece kanser oluşumunu teşvik etmektedir. Obez kişiler genellikle, zamanla kansere yol açan DNA hasarına neden olabilen, kronik düşük seviyeli inflamasyona sahiptir (Gregor ve Hotamisligil, 2011). Obezite; büyüme faktörlerini (insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi), hormonları (insülin, testosteron, östrojen ve diğer androjenler gibi), adipokin seviyelerindeki değişimleri (leptin seviyelerinde artma ve adinopektin seviyelerinde azalma gibi), intrasellüler sinyal yollarını (fosfotidil inositol 3-kinaz (PI3K)/ protein kinaz B (AKT)/ rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) ve 5-adenozin monofosfat ile aktive olan kinaz (AMPK) gibi), sitokinleri, makrofaj infiltrasyonunu, immün hücreler ve inflamatuvar faktörleri (nükleer faktör- κ B, (NF κ B) gibi) etkileyerek karsinogeneze sebep olmaktadır (Urhan ve Akbulut, 2017).

Obez bireylerde insülin ve IGF-1'in de endometriyum, kolon ve meme kanserlerini tetiklediği bildirilmektedir. Obezlerde daha yüksek olan kanser oranının cinsiyet hormonlarını bağlayan globulinden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Dönmez ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar IGF'lere etki eden mekanizmalar üzerine

yoğunlaşmıştır. IGF'lerin vücutta insülin hormonu gibi görev yaptığı bilinmektedir. Kanda serbest halde dolaşan oleat (doymamış yağ asidi) ve palmitat (doymuş yağ asidi) gibi çok bilinen bazı yağ asitlerinin IGF üzerine etkileri bulunmaktadır. Bu iki yağ asidi IGF'lerin üretimi ve aktivitesini etkilerler. IGF'ler apoptozisin gerçekleşmemesi için hücrelere güçlü sinyaller yollar ve sinyaller normalden daha yükseğe hasar görmüş hücreler ölmez, kontrolsüz bir şekilde büyür ve kanser hücrelerinin oluşumuna neden olurlar (Dönmez ve ark., 2008).

Obezite vücutta depolanan yağ miktarının artmasına, uzun süreli enerji dengesizliğine ve kanda dolaşan serbest yağ asidi miktarının artmasına neden olmaktadır. Kanda yüksek olan serbest yağ asidi düzeyi insüline karşı direncin gelişmesine sebep olur. İnsülin direnci ise diyabet, kalp hastalıkları ve çeşitli kanser türleri ile yakından ilişkilidir. İnsülin direnci gelişiminde insülin sinyal mekanizmasını ilgilendiren postreseptör düzeydeki defektler önem kazanmaktadır (Görgişen, 2018). Tirozin kinaz aktivitesi ile tirozin rezidülerinin otofosforilasyonu meydana gelir. İnsülin reseptör aktivasyonunun ilk adımı gerçekleşir. İnsülin reseptörünün aktivasyonu, reseptörle ilişkide bulunan ve insülin reseptör substratı (IRS) denilen bir seri proteinin serin-treonin grubunda fosforilasyona neden olur ve böylece insülinin hangi etkiyi göstereceğini belirleyen sinyal yolları harekete geçer. Fosfatidil inozitol 3 kinaz (PI 3 kinaz) yolağı ve mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağı olarak iki ana yolak mevcuttur. Fosfatidil inositol 3-kinaz (PI3K) yolağı, glukozun hücre içine alınmasıyla ilişkili kaskad sisteminden sorumluyken, mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) yolağı protein sentezi ile ilgili genlerin ekspresyonundan sorumludur (Bakiner, 2007).

IRS, PI3K'nın düzenleyici etkiye sahip p85 α alt ünitesine bağlanması, PI3K aktivasyonu ile sonuçlanmakta ve Akt'nin de içinde yer aldığı yolların aktivasyonu gerçekleşmektedir (Görgişen, 2018, Şekil 1). Bu durum, insülinin metabolik etkileri kadar, hücre büyümesi çoğalması, farklılaşması ve mitojenik etkilerinin oluşması için de gereklidir. T2D'li ve obez hastalarda, insülin reseptörünün aşağı yönündeki PI3K insülin sinyal sisteminin p85 α alt ünitesinde oluşan değişikliklere bağlı olarak baskılanmasıyla yolak aktivasyonunun bozulduğu insülin direncininin tetiklendiği bilinmektedir (Görgişen, 2018).



Şekil 1. GLUT4 translokasyon yolağı. PI3-K: Fosfatidil inositol 3-kinaz, AKT: Protein kinaz B, IR: İnsülin reseptör, IRS: İnsülin reseptör substrat (Carmichael ve ark., 2019'dan uyarlanmıştır)

Obezite ve insülin direnciyle ilişkili diğer bir sitokin olan IL-6'nın ifadesinin %30'undan yağ dokusu sorumludur ve serum IL-6 düzeyleri ile serbet yağ asitleri düzeyleri arasında belirgin bir ilişki vardır (Bastard ve ark 2002). IL-6, STAT proteinlerinin aktivasyonuna yol açarak PI3K ve Akt'yi aktive etmektedir. Bu aktivasyon MAP kinazların aktivasyonuna neden olur (Meng ve ark 2005). Kendisi de bir MAP kinaz olan JNK, serin/treonin kinaz özelliği ile IRS'yi fosforile ederek insülinin sinyal iletimini bozar ve insülin direncine neden olur (Hirosumi ve ark 2002).

Yağ dokusundan salınan faktörlerden tümör nekroz faktör (TNF α), retinol-bağlayıcı protein 4 (RBP4) ve resistin yakın zamanda obezite kaynaklı insülin direnci ile ilişkili olduğu bulunan diğer adipokinlerdir (Göktaş ve Besler, 2015).

2.3. Dünya Geneline Obezitenin Görülme Sıklığı

DSÖ'nün 2010 yılında, aşırı kilo ve obezite ile ilgili komplikasyonlar dünyada en az 4 milyon insanın ölümüne neden olmuştur. DSÖ 2014 verilerine göre, dünya nüfusunun % 39'u aşırı kilolu, %13'ü obezdir (Zakharova ve ark., 2019). 2015 verilerine göre; obezite insidansı dünya genelinde 600 milyondan fazla (WHO, 2015). Obezite sıklığı son otuz yılda iki katına çıkmıştır (Cerdo ve ark., 2019). DSÖ'ye göre 2016'da 18 yaşın üzerindeki 1.9 milyardan fazla (%39) kişi aşırı kilolu ve 600 milyon (%13) kişi obez olarak sınıflandırılmıştır ve 2035 yılında, günümüz toplumundaki insanların % 39'unun obez olacağı tahmin edilmektedir (Cerdo ve ark., 2019).

Çocuk ve yetişkinlerde tek yumurta ikizleri ile yapılan çalışmalarda genetik katkının % 40-70 olduğu belirtilmektedir (Ford ve ark., 2017).

2.4. Çocukluk Çağı Obezitesi

Çocukluk çağı obezitesinin prevalansı dünya çapında sürekli artış göstermektedir. 2013 yılında, gelişmiş ülkelerde %23.8 erkek ve %22.6 kız çocuk aşırı kilolu veya obezdir, gelişmekte olan ülkelerde erkeklerin % 12.9'u ve kızların % 13.4'ü fazla kilolu veya obezdir (Wang ve ark., 2017). Ayrıca, çocuklukta obezite son 25 yılda bebekler ve küçük çocuklarda (5 yaş) katlanarak artmış olup, 1990'da küresel olarak 32 milyondan, 2013' te 42 milyona yükselmiştir (Cerdo ve ark., 2019). Günümüzde çocuklar arasındaki en yaygın beslenme bozukluğudur (Cerdo ve ark., 2019). Yaklaşık 43 milyon okul öncesi çocuğun yüksek kilolu ya da obez olduğu bilinmektedir. 1990 yılından 2010 yılına kadar bu sayı % 60 artış göstermiştir ve 2020 yılına kadar dünya çapında 60 milyon çocuğu etkileyeceği tahmin edilmektedir (Huang ve ark., 2015; Zakharova ve ark., 2019).

Obez çocuklar ileriki yaşamlarında; ateroskleroz, T2D, hipertansiyon, ve kanser gibi ölümcül hastalıklar için yüksek risk taşımaktadırlar (Huang ve ark., 2015). İnsan ve deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda erken yaşamdaki çevresel faktörlerin ileriki dönemde obezite ve metabolik hastalık riskiyle bağlantılı olduğu görülmüştür (Huang ve ark., 2015).

2.5. Obezitenin Hesaplanması

Obeziteyi belirlemek için; yağ kalınlığının X ışını ile ölçümü, cilt yağ kalınlığının ölçümü, vücut dansitesinin ölçümü, VKİ, toplam vücut su oranının ölçümü, Bel/Kalça oranı, boya göre ağırlık ölçümü gibi çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır (Sandalcı, 2018). DSÖ tarafından obeziteyi belirlemek için bu yöntemler arasında VKİ esas alınmaktadır. VKİ, vücut ağırlığının kilogram cinsinden, boy uzunluğunun metre cinsinden karesine bölünmesi ($VKİ=kg/m^2$) ile hesaplanır. Buna göre erişkinlerde VKİ'nin 25'in üzerinde olduğu kişiler aşırı kilolu, 30'un üzerinde olanlar obez olarak tanımlanır.

VKİ değerleri çocuklarda cinsiyete ve yaşa göre değişiklikler göstermektedir. DSÖ tarafından 2006 yılında 0-5 yaş çocuklar, 2007 yılında ise 5-19 yaş grubu çocuklar

ve adölesanlar için büyüme standartları yayımlanmıştır (Sandalcı, 2018). Böylece günümüzde DSÖ tarafından kullanılan referanslar doğrultusunda çocuk ve adölesanlar için cinsiyet ve yaşa göre düzenlenmiş olan, boy ve vücut ağırlığını gösteren tablolardan yardım alınarak, çocuğun yaşına ve boyuna uygun ağırlığı hesaplanmaktadır. Boy ve yaşına göre çocuğun 50 persentil olduğu ağırlığı, ideal ağırlığı olmaktadır (Neyzi ve ark., 2008). DSÖ'nün persentil eğrilerine göre VKİ normogramları tablo 2'de verilmiştir. Geç adölesan dönemle birlikte persentiller erişkin değerlerine yaklaşmaktadır; 95 persentil $\approx$ 30kg/m² ile eşdeğerdir (Neyzi ve ark., 2008).

Tablo 2. Çocuk ve adölesanlarda ağırlık sınıflaması

VKİ < 5 persentil	ZAYIF
5 persentil $\leq$ VKİ < 85 persentil	NORMAL
85 persentil $\leq$ VKİ < 95 persentil	FAZLA KİLOLU
VKİ $\geq$ 95 persentil	OBEZ

2.6. Obezite Genetiği

İnsanlarda obezite monogenik ya da multifaktöriyel kalıtım modeline uymaktadır. Obezitenin monogenik versiyonu; Leptin (*LEP*), Leptin reseptörü (*LEPR*), Melanocortin 4 reseptörü (*MC4R*), Melanocortin 3 reseptörü (*MC3R*), Proopiomelanokortin prohormon geni (*POMC*), Aguti ilişkili peptit geni (*AgPR*), gibi belli genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Bunların sıklığı toplam olguların çok az bir kısmını oluşturur. Poligenik kalıtım, multifaktöriyel kalıtım modeli gösteren formları ise en yaygın versiyonudur ve genler, çevre, davranış ve hepsinin birbiriyle etkileşiminin bir sonucudur (Gao ve Liu, 2014).

Leptin Geni: Adipoz kökenli olan leptinin dolaşımdaki miktarı yağ kütlesi ile orantılı olup, besin alımını azaltıcı ve enerji harcamasını artırıcı yönde etki gösterdiği ve böylece vücut ağırlığı homeostazını düzenlediği ortaya konulmuştur (Tritos ve Mantzoros, 1997). Leptin eksikliği ve dolayısıyla obeziteye yol açan mutasyonun leptin hormon terapisi ile geri çevrilebildiği gösterilmiştir. Leptin etkisini NPY, MCH, oreksinler ve AgPR gibi oreksijenik nöropeptidleri downregüle ederek ve a-MSH,

CART, CTRH gibi bazılarının da upregüle ederek iştahı azaltıcı bir etki ortaya koymaktadır (Sözen, 2006). Hipotalamusta en az bir gen tarafından kodlanarak leptin bağlanması ve JAK/STAT (Janus kinase/signal transducers and transcription) yolunun aktivasyonu ile regüle edilen hormon nöropeptid Y (NPY) dir. NPY enjeksiyonu ile oluşan hiperfajik etki leptin kullanımı ile azalmaktadır. Leptin hipotalamik reseptörleri üzerinden gıda alımının en güçlü uyarıcısı olan NPY nin salınımını inhibe eder. Böylece iştahın azalmasına, sempatik sinir sisteminin aktive olmasına ve enerji harcanmasında artışa neden olur (Gültürk ve Demirkazık, 2007). Hipotalamustaki iştahı ve vücut ısını düzenleyen diğer bir nöromediatör olan melanosit uyarıcı hormon (MSH) iştahı azaltarak etki gösterir. Leptin santral MSH seviyesini artırarak bir başka yoldan da iştahın azalması yönünde etki gösterir. Leptin ve insülin arkuat nükleustan salgılanan çok kuvvetli bir iştah uyarıcısı olan NPY yi baskılayarak gıda alımına engel olur. Aynı zamanda paraventriküler nükleustan kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) salınımını uyarak yine gıda alımına engel olur (Itateyama ve ark., 2003).

Leptin Reseptör Geni: Başlıca hipotalamusta ifade edilen *LEPR* geninin kodladığı leptin reseptörü; Leptin'in ağırlık düzenleyici etkisinin hipotalamusta ve özellikle onun uzun izoformuna bağlanması ve aktifleşmesi sonucu ortaya çıkmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Chung ve ark., 1998). *LEPR* genindeki varyasyonların da enerji harcaması, fiziksel aktivite düzeyi ve abdominal obezite boyutunu etkilediği ve bazı obezite fenotipleri ile ilişkilendirildiği rapor edilmiştir (Stefan ve ark., 2002).

Melanokortin 4 Reseptör Geni: *MC4R* geninin kodladığı ürün predominant nöronal melanokortin reseptörü olarak 7 transmembran bölgesi bir G proteini ile eşleşen reseptördür. *MC4R*'nin obezitedeki rolü; genin farelerde fonksiyon dışı bırakıldığında obeziteye yol açması ile gösterilmiştir (Huszar ve ark., 1997). Mutasyon analizi çalışmaları ile, *MC4R* geni mutasyonlarının insanlardaki %1-6 erken dönem ortaya çıkan veya şiddetli obezite olgularından sorumlu tutulduğunun gösterilmesiyle bulgu teyit edildi (Sözen, 2006).

Aguti İlişkili Peptid Geni: İştah arttırıcı (oreksijenik) bir nöropeptid olan AgRP ilk defa Agouti proteinine olan homolojisi dolayısıyla tanımlanmıştır (Shutter ve ark., 1997). Lokal olarak beyinde hipotalamusun arkuat nükleusunun yanı sıra, testis ve adrenal bez gibi perifer dokularında da ifade edilmekte ve besin alımı ve enerji dengesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Sözen, 2006). Besin alımını arttırıcı

güçlü iştah açıcı etkisini; farelerde intraserebroventriküler AgRP uygulandığında kısa ve uzun vadeli hiperfaji ve obeziteye yol açması kanıtlamıştır (Lu ve ark., 2001). Ayrıca enerji harcanımını azalttığı (veya baskıladığı) ve bu sayede enerji homeostazını etkilediği de rapor edilmiştir (Small ve ark., 2003).

Proopiomelanokortin Prohormon Geni (*POMC*): Hipotalamusun arkuat nükleusunda ifade edilen *POMC* geni Leptin sinyaline cevaben hipotalamusta enerji hemostazının kontrolünde rol oynayan melanokortin sisteminin önemli bir elemanıdır. Leptin anorektik ve metabolik etkisini en azından kısmen *POMC* geninin ürünü ve özellikle de α -MSH aracılığıyla MC4R'ünü aktifleştirerek ortaya koyar. Bu etki onun endojen antagonisti olan AgRP tarafından antagonize edilir. (Ollmann ve ark., 1998). Bu gendeki polimorfizmler (R236G) ile vücut yağ dağılımı ve obezite arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Sözen MA, 2006).

Hipoksi indükleyici faktör 3A Geni (*HIF3A*): 19. kromozomda 19q13.12 bölgesinde lokalizedir, 53386 bp ve 13 ekzondan oluşur. Bu gen tarafından kodlanan protein, çeşitli dokularda hipoksi tepkisine aracılık eden heterodimerik transkripsiyon faktörlerinden birinin α -3 altbirimidir. Bunlar, oksijen-labil α -altbiriminden ve konstitütif olarak eksprese edilen β -altbiriminden oluşur. α -altbirimin; HIF1 α , HIF2 α ve HIF3 α 'nın mevcut üç izoformu, HIF β ile dimerize edildikten sonra farklı fonksiyonlara sahip transkripsiyon faktörlerinin oluşumuna izin verir. HIF3 α 'nın çoklu izoformları mevcuttur (NCBI, 2019). HIF3 α bağımsız olarak veya HIF1 α ile birlikte çalışarak bazı hedef genleri aktive edebildiğinden, glikoz ve amino asit metabolizması, apoptoz, proteoliz, p53 sinyalizasyonu ve PPAR sinyalizasyonunda HIF3 α 'nın rol oynadığını düşündürmektedir. Buna ek olarak, HIF3 α 'nın adiposit farklılaşmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Pfeiffer ve ark., 2016). *HIF3A* geninin metilasyonunun VKİ ve adipozite ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (Wang ve ark., 2015). Obezite adipoz dokuda hiperplazi ve hipertrofi artışına bağlı inflamasyon ve insülin rezistansı ile karakterizedir. Obezitenin başlattığı inflamasyon inflamatuvar cevabı tetikleyerek, inflamatuvar mediatörler (sitokin ve akut faz proteinlerin artışı) ve yağ asitlerinin dolaşıma salınımı, inflamatuvar dokuya lökosit göçü ve doku lökositlerinin aktivasyonu ile insülin sinyalini bozar, metabolik ve hipoksik oksidatif stresi başlatır, endotel disfonksiyonu ve sistemik insülin direnci gelişimine yol açarlar (Mcgregor ve Choi, 2011; Ge ve ark., 2014). Adipoz doku kan akımında azalma sonucu oluşan hipoksi,

adiposit ve makrofajlarda nükleer faktör kappa B (NF-kB) ve hipoksi indusiblen faktör- α (HIF- α) gibi birçok sinyal yollarının aktivasyonu, adiposit ölümü ve lipoliz ile adipoz dokuda inflamasyon oluşumunu meydana getirir. Endoplazmik retikulum (ER) hücre proteinlerinin sentez ve katlanma yeridir ve hücre sel strese hassastır. ER'ü etkileyen oksidatif stres katlanmamış protein cevabını (UPR) başlatır. ER stres ve UPR- IkappaB kinaz (IKK) NF-kB yolu ve jun-N terminal kinaz-aktivatör protein 1 (JNK-API) aktivasyonunu ile reaktif oksijen türevlerinin (ROS) üretimi ve akut faz cevabını başlatarak obezite ile ilgili inflamasyon ve metabolik anormalliklere neden olur (Ge ve ark., 2014).

İnterlökin-6 Geni (IL-6): 7. kromozomun 7p15.3 bölgesinde lokalizedir, 11856 bp ve 6 ekzondan oluşur. Bu gen, inflamasyon ve B hücrelerinin olgunlaşmasında işlev gören bir sitokini kodlar. IL-6 yaklaşık 26 kD luk bir sitokin olup, mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreleri ile bazı aktive T hücreleri tarafından sentez edilir. Buna ek olarak, kodlanmış proteinin, otoimmün hastalıkları veya enfeksiyonları olan insanlarda ateş yaratabilen endojen bir pirojen olduğu gösterilmiştir (NCBI, 2019). Protein öncelikle akut ve kronik iltihaplanma bölgelerinde üretilir ve buradan seruma salgılanır ve interlökin 6 reseptörü alfa vasıtasıyla transkripsiyonel bir inflamatuvar tepki başlatır. Bu genin işleyişi diyabet ve sistemik romatoid artrit şüphesi de dahil olmak üzere çok çeşitli iltihap ile ilişkili hastalık durumlarıyla ilişkilendirilir (Koçak ve ark., 2014). Beyaz adipoz doku, metabolik olarak en önemli adipoz dokudur, inflamasyon durumunda merkezi bir rol oynar ve TNF- α ve IL -1, IL-6, IL-10 ve IL-12 gibi pro-inflamatuvar sitokinleri eksprese eder. IL-6'nın obezlerde salınımının daha yüksek olduğunu, IL-6'nın vücut ağırlığı ve lipid metabolizmasında düzenleyici bir rol aldığını gösteren çalışmalar mevcutken, IL-6, leptin, CRP ve fibrinojen ilişkisi araştırılıp ve IL-6 ile obezite arasında ilişki bulunmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Cerdo ve ark., 2019).

2.7. Epigenetik ve Obezite

“Epigenetik; prokaryot ve ökaryotlarda DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan hücreler ve organizmaların bir sonraki nesillerine aktarılabilen fenotipik varyasyonlardır” (Jablonka ve Lamb, 2010).

Epigenetik mekanizmalardan birincisi DNA modifikasyonu (metilasyon), ikincisi histon modifikasyonu (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, S-nitrosilasyon, sumolasyon, ubukitinasyon) ve üçüncüsü ise post-transkripsiyonel olarak kodlama yapmayan RNA’ların gen ifadesini değiştirmeleridir (Sırıken ve ark., 2018, Tablo 3).

Tablo 3. Epigenetik mekanizmalar (Sırıken ve ark., 2018’den uyarlanmıştır)

DNA MODİFİKASYONLARI	
➤ DNA Metilasyonu	
KROMATİN MODİFİKASYONLARI	
Kovalent	Non-Kovalent
➤ Asetilasyon ➤ Metilasyon ➤ Fosforilasyon ➤ S-Nitrosilasyon ➤ Sumolasyon ➤ Ubukitinasyon	➤ Kromozom içi ve kromozomlar arası etkileşimler ➤ Histon Takasları ➤ Kromatin Tamiri ➤ Non-koding RNA ile etkileşim
POST-TRANSKRİPSİYONEL ETKİ	
➤ Post-transkripsiyonel mekanizmalar olan non-koding RNA’nın (siRNA, miRNA, IncRNA vb.) mRNA’yı etkileyerek protein sentezini engellemesini	

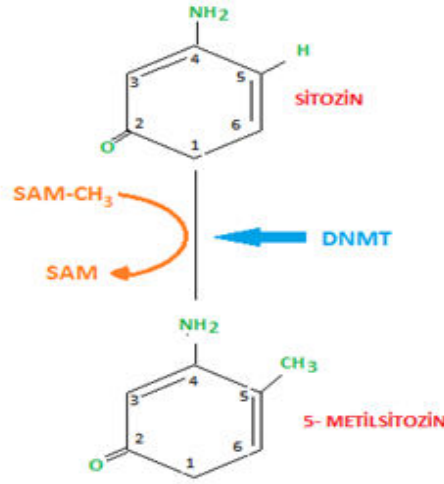
Epigenetik varyasyon üç ana mekanizmaya bağlı olarak gen ifadesini uyarabilir veya baskılayabilir (Sırıken ve ark., 2018). Birinci mekanizma olan DNA metilasyonu, promotor bölgelerden gen susturulmasına neden olur (Sırıken ve ark., 2018). İkinci mekanizma da, histon proteinleri (H2A, H2B, H3 ve H4’ün iki kopyasından oktomer oluşur) DNA’yı sarar ve nukleozomu oluşturur, histon metilasyonu transkripsiyona

hazır genlerin yakınında baskılayıcı ya da aktif bir işarete neden olur (Sırıken ve ark., 2018). Uzun non-koding RNA (lncRNA) ve küçük non-koding RNA'lar (siRNA, miRNA) gibi nonkoding RNA'lar üçüncü epigenetik mekanizmadır ve mRNA'yı hedef olarak protein sentezini post-transkripsiyonel olarak engeller (Sırıken ve ark., 2018).

Ebebeyn gametleri, fetus ve erken postnatal gelişimin epigenetik programlamasını çevresel faktörler etkiler. Çevresel maruziyetlere yanıt olarak dokudaki gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi, yaşam boyunca değişebilir (Lopomo ve ark., 2016). Çevresel faktörler tarafından meydana gelen epigenetik değişiklikler, obezite, TD2 ve kardiyovasküler hastalıklar gibi metabolik bozukluklar ile ilişkili bulunmuştur (Sırıken ve ark., 2018). Genetik olarak aynı olan monozigotik ikizler, epigenetik farklılıklar nedeniyle metabolik hastalıklarda farklılıklara sahip olabilirler (Nilson ve ark., 2014). Genetik varyasyonlar düşük oranda kalıtsal hastalık (obezitedeki payı % 2-10) risklerinden sorumludur (Locke ve ark., 2015). Prenatal ya da postnatal dönemde besin kıtlığı veya fazlalığı obezite sıklığında önemli artışa neden olan epigenetik programlamaya neden olmaktadır (Van ve ark., 2015).

2.7.1. DNA Metilasyonu

DNA düzeyindeki modifikasyonların en bilinen ve en işlevsel olanı DNA metilasyonudur (İzmirli, 2013). Metil transferaz (DNMT) denilen ve 3 izoformdan oluşan enzimler (DNMT1, DNMT3b ve DNMT3a) tarafından, 5'-sitozinfosfat-guanozin-3' dinükleotidlerin sıklıkla bulunduğu 500-2000 baz çifti uzunluğundaki DNA bölgelerinde yer alan CpG (sitozin fosfat Guanin) adacıklarında DNA metilasyonu gerçekleşmektedir (Sırıken ve ark., 2018). DNMT1, mitotik hücre bölünmesi sırasında yeni oluşan hücrelere metilasyon profilini kopyalamaktan sorumlu iken, DNMT3a ve 3b ise novo metilaz enzimleri olarak işlev görürler (Sırıken ve ark., 2018). DNA metilasyonu gen ifadesini değiştirerek hücre fonksiyonlarını değiştiren, bir metil grubunun kovalent şekilde DNMT katalizinde, bir CpG (sitozin fosfat guanin) dinükleotidindeki sitozin bazının primidin halkasının 5. karbonundan yapıya eklenmesi ile oluşur (Yi, 2009, Şekil 1). Metil vericisi olarak S-Adenozil Metiyonin (SAM) görev yapar (İzmirli, 2013).



Şekil 1. DNA metilasyonu. SAM: S-Adenozil Metiyonin, DNMT: DNA metil transferaz (Zhu ve Yao, 2009'dan uyarlanmıştır)

Promotor bölgesinde yer alan ve CpG adacıklarında görülen DNA metillenmesi transkripsiyon düzeyinde kalıtılabilir gen susturulmasına yol açar (Yi, 2009). CpG adacıklarında görülen gen ifadesinin düzenlenmesinde, özellikle genlerin promotor bölgelerindeki metillenme, transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgesine bağlanma yerlerinde değişiklikler meydana getirerek gen ifadesinin baskılanmasına neden olmaktadır (Yi, 2009). Erişkin somatik dokularda DNA metilasyonu tipik olarak CpG dinükleotit dizilerinde meydana gelir. CpG dışı metilasyon embriyonik kök hücrelerde hakimdir (İzmirli, 2013). Metilasyon DNA'nın inaktive olmasına neden olarak protein ekspresyonunu engelleyen bir sistemdir (İzmirli, 2013).

Diyet, vücut ağırlığının epigenetik düzenlenmesini etkileyebilir. Epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonu ile açıklanan obezite ile ilişkili hayvan deneylerinden biri agouti fare modelidir. Agouti lokusu, faredeki kürk rengini kontrol eder. Fare kürkünün sarı renge değişmesine ve hipotalamustaki melanokortin 4 reseptörüne (MC4R) bağlanarak antagonistik fonksiyonunun bozulmasına neden olan bir mutasyon, agouti proteinin anormal bir yerde ekspresyonuna yol açarak obeziteyi uyarır. Agouti geni, siyah ömelanin veya sarı faömelanin üretimine yol açan parakrin sinyalleri kodlamakta ve böylece farelerin tüy renginde belirleyici olmaktadır. Bu gen, metile olmamış durumdayken aktiftir ve sarı, obez, kansere yatkın fareler oluşturur. Fakat hamile olan fare bu süreçte metilden zengin diyetle beslendiğinde doğan farelerin büyük bir kısmında gen metillenir ve sessiz hale geçtiğinden fenotipleri kahverengi ve

zayıf hale gelir (Usanma Koban ve ark., 2017). Koruyucu etkiler, karaciğerde ve kasta DNA metilasyon değişiklikleri sonucu vücut ağırlığı, insülin duyarlılığı ve lipid profilleri düzelen maymunlarda da gözlenmiştir (Lopomo ve ark., 2016).

Yapılan çalışmalarda düşük kalorili diyetle beslenme neticesinde bireylerin periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) TNF α promotöründe metilasyon oranının azaldığı bildirilmiştir (Campion ve ark., 2009). Düşük kalori ile beslenen bireylerin yağ dokusunda 35 farklı lokusta DNA metilasyonu bulunmuş ve yüksek kalorili beslenme sonrasında ise kas dokusunda oksidatif enerji metabolizması ile ilişkili olan peroksizom proliferator aktive edici reseptör gama koaktivatör 1- alfa (PGC-1 α) geninde DNA metilasyonu bildirilmiştir (Bouchard ve ark., 2010). Memeli preadipositleri ile olgun adipositler arasında DNA metilasyonu açısından farklılıklar bulunmuştur (Zhu ve ark., 2012). Adipogenezde transkripsiyonel düzenlenmesinde rol alan peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma geninin promotör bölgesi 3T3-L1 preadipositlerde hipermetile olduğu görülürken farklılaşma ile birlikte demetillenmekte olduğu rapor edilmiştir (Fujiki ve ark., 2009). Neticede adiposit farklılaşmasında epigenetik mekanizmaların önemli rol oynadığı kanıtlanmaktadır. Erişkin fare hipotalamusunda iştah ve birçok endokrin fonksiyonun düzenlenmesinde etkisi olan 256 baskılanmış yeni aday gen bulunmuştur (Güçlü-Geyik ve Erginel-Ünaltuna, 2013). Obez bireylerin periferik kan lökositlerinde ubiquitin ilişkili ve SH3 domain içeren A (UBASH3A) geninde yüksek metilasyon bildirilirken, Tripartite motif protein 3 (TRIM3) geninde düşük metilasyon olduğu bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2012). İnsulin direnci ile ilişkili olan TFAM (transkripsiyon faktör A, mitokondriyel) gen promotöründe metilasyon gözlenmiştir (Güçlü-Geyik ve Erginel-Ünaltuna, 2013). Uzun süre yüksek yağlı diyet ile beslenme neticesinde DNA demetilaz enzimini kodlayan FTO (yağ kütlesi ve obezite ilişkili) ve MCR4 genlerinde metilasyonun azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca PPARY (peroksizom proliferatör aktive edilmiş reseptör y), POMC (proopiomelanokortin) ve leptin genlerinde de diyet ile değişen DNA metilasyonları bildirilmiştir (Güçlü-Geyik ve Erginel-Ünaltuna, 2013).

DNA metilasyonun belirlenmesinde bisülfid modifikasyonu yaygın olarak kullanılır. Gerçekleşecek reaksiyonda, 5-metil sitozin modifiye edilmezken metillenmemiş sitozin seçici olarak deamine olacak ve urasile dönüşümle sonuçlanacaktır (Patterson ve ark., 2011).

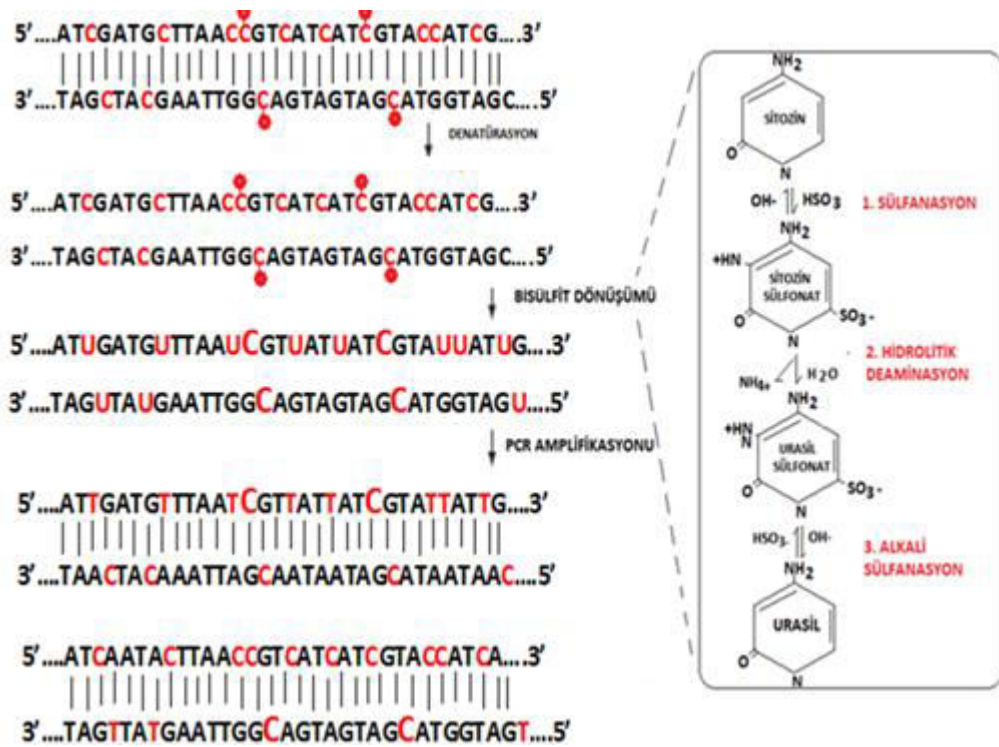
Sodyum bisülfid ile sitozinlerin deaminasyonu:

1.Sülfonasyon: Bu aşamada bisülfid sitozinin 5-6 çift bağına eklenir.

2.Hidrolitik Deaminasyon: Bisülfid ekli sitozinin hidrolitik deaminasyonla bisülfid içeren urasile dönüştüğü aşamadır.

3.Alkali Desülfonasyon: Alkali muamelesi ile urasilden sülfonat (SO_3^-) grubunun uzaklaştırıldığı aşamadır (Patterson ve ark., 2011, Şekil 2).

Metillenmiş sitozin bu kimyasal işleme dirençli olduğu için metillenmiş ve metillenmemiş CpG, MSP yöntemiyle belirlenebilir (Zhu ve Yao, 2009).



Şekil 2. Bisülfid modifikasyonu ve PZR sonrası DNA dizisindeki değişimler (Patterson ve ark., 2011'den uyarlanmıştır)

DNA metilasyon özellikleri obez ve diyabetik hastalarda, adipoz doku, karaciğer, iskelet kası ve pankreas da dahil olmak üzere metabolik değişim geçiren dokularda artarak keşfedilmektedir (Tablo 4). Epigenetik yeniden programlama, kritik yolları veya şu düzenleyici işlemleri etkileyebilir (Cheng ve ark., 2018):

1. İnsülin sinyali

2. İnsülin sekresyonu

3. Adiposit farklılaşması, transdifferansiyasyonu ve işlevi
4. Mitokondriyal fonksiyon ve redoks düzenlemesi
5. Lipit ve glukoz homeostazı
6. Sitokin sinyalizasyonu ve inflamasyon
7. Hücre döngüsü, apoptoz ve otofaji

Epigenetik yeniden programlama ile kritik yolları düzenleme işlemleri obezite ve TD2 patogeneğinde rol oynamaktadır (Cheng ve ark., 2018). Örneğin, adiposit farklılaşması veya büyümesi, yağ dokusunun artmasına katkıda bulunabilir ve kronik inflamasyon ve insülin direnciyle ilişkili olan sitokin sekresyonunu ve sinyal yollarını düzensizleştirir (Saltiel, 2012; Rutkowski ve ark., 2017). Öte yandan, adiposit transdifferentiasyonunun gerçekleştiği beyaz adipoz dokusunun esmerleşmesi, enerji tüketimini artırabilir, obeziteyi önleyebilir ve insülin duyarlılığını artırabilir (Bartelt ve Heeren, 2014; Altshuler-Keylin ve Kajimura, 2017).

Tablo 4. Metabolik olarak kritik dokularda DNA metilasyonunun yeniden programlanması (Cheng ve ark., 2018; Wang ve ark., 2016; Arner ve ark., 2016'dan uyarlanmıştır)

Doku tipi	Tıbbi durum	DNA metilasyonu ile yeniden programlanan genler	Fizyolojik veya patofizyolojik ilişki
Adipoz doku	Obezite	2223 farklı şekilde eksprese edilmiş genler için 5529 farklı şekilde metillenmiş DNA bölgeleri	% 25 gen adipogenez, % 19 insülin sinyalizasyonu, % 27 lipoliz (Arner ve ark., 2015)
	T2D	15627 farklı şekilde metilasyon	İnsülin sinyalizasyon, adipogenez ve metabolizma (Nilsson ve ark., 2014)
	Obezite, insülin direnci	COL5A1, GAB1, IRS2, PFKFB3 ve PTPRJ	İntegrin hücre yüzeyi etkileşimleri ve insülin sinyalleşmesi (Arner ve ark., 2016)
	Aşırı kilo, obezite, T2D ve yaşlanma	FHL2, NOX4, PLG, ELOVL2, KLF14, GLRA1, FTO, ITIH5, MTCH2, IRS1 ve SPP1, HIF3A	Glukoz ve yağ asidi metabolizması, mitokondriyal fonksiyon, oksidatif stres, insülin sinyali, kemokin sinyali, adiposit farklılaşması (Ronn ve ark., 2015)
	Obezite, T2D	HIF3A	Glukoz ve amino asit metabolizması, apoptoz, proteoliz, p53 ve PPAR sinyalleşmesi ve adiposit farklılaşması / adipozite (Dick ve ark., 2014)
	Düşük doğum ağırlığı nedeniyle yüksek T2D riski	PPARGC1A	Mitokondriyal biyogenez, enerji harcaması ve dengesi, beyaz yağ dokusunun kahverengileşmesi (Gillberg ve ark., 2014)
	Aşırı kilo ve obezite	CPT1A, ABCG1, LYS6GE, KDM2B, RALB, PRRL5, LGALS3BP, C7orf50, PBX1, EPB49 ve BBS2	Uzun zincirli yağ asitlerinin ve trigliserit metabolizmasının mitokondriyal alımı; makrofaj kolesterol ve fosfolipidlerin taşınması ve lipid homeostazi; bağışıklık fonksiyonu ve inflamatuvar yollar (Demerath ve ark., 2015)

Tablo 4. Metabolik olarak kritik dokularda DNA metilasyonunun yeniden programlanması (Cheng ve ark., 2018'; Wang ve ark., 2016; Arner ve ark., 2016'dan uyarlanmıştır, Devam)

Doku tipi	Tıbbi durum	DNA metilasyonu ile yeniden programlanan genler	Fizyolojik veya patofizyolojik ilişki
Karaciğer	Aşırı kilo, obezite ve T2D	ABCG1, PHOSPHO1, SOCS3, SREBF1 ve TXNIP	Glukoz ve lipid homeostazı, HDL kaynaklı insülin sekresyonunda artış (Dayeh ve ark., 2016)
	T2D	GRP10, ABCC3, MOGAT1 ve PRDM16'yı kapsayan 251 farklı metillenmiş bölgeler ve PPP1R1A, RIPK4, H19, TICAM1, MYH10 ve RAD50 dahil olmak üzere DNA metilasyonunun yanı sıra farklı gen ekspresyonunu gösteren 29 gen	İnflamatuvar yanıtta, karaciğerde insülin duyarlılığı, büyüme ve metabolizma, hepatik glikojen sentezi ve glukoz homeostazı, yağ asidi oksidasyonu, enerji homeostazı (Nilsson ve ark., 2015)
	Obezite, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı	DNA metilasyonu	Mitokondriyal fonksiyon, insülin direnci, alkolik yağlı karaciğer hastalığı aktivite skoru ve karaciğer kanseri (Horvath ve ark., 2014)
	Obezite ve T2D	PRKCE, ABR, PDGFA, ARHGEF16, ADCY6, RPS6KA1, CTBP1, CCND1, WNT11 ve ATF motifleri	İnsülin sinyalizasyon, hepatik glikoliz, de novo lipogenez (Kirchner ve ark., 2016)
	Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı	TET, PPARGC1A, TFAM ve MT-ND6	Mitokondriyal biyogenez ve fonksiyon, apoptoz, insülin direnci, lipid metabolizması (Pirola ve ark., 2013)
İskelet Kası	Obezite, T2D, alkolik steatohepatit	LDHB	Glikoliz, kanser gelişimi ve metastaz (De Mello ve ark., 2017)
	Obezite, T2D veya düşük doğum ağırlığı	PPARGC1A ve PDK4	Mitokondriyal fonksiyon, yaşa bağlı metabolik disfonksiyon inflamasyon ve dislipidemi (Barres ve ark., 2013)
	T2D	DAPK3	Hücre proliferasyonu, apoptoz ve otofaji, karşılıklı insülin ve glukoz yanıtı (Mudry ve ark., 2017)
	Aşırı kilo, obezite ve T2D	ABCG1, PHOSPHO1, SOCS3, SREBF1 ve TXNIP	Glukoz ve lipid homeostazı, redoks, HDL kaynaklı insülin sekresyonunda artış (Dayeh ve ark., 2016)

Tablo 4. Metabolik olarak kritik dokularda DNA metilasyonunun yeniden programlanması (Cheng ve ark., 2018; Wang ve ark., 2016; Arner ve ark., 2016'dan uyarlanmıştır, Devam)

Doku tipi	Tıbbi durum	DNA metilasyonu ile yeniden programlanan genler	Fizyolojik veya patofizyolojik ilişki
	T2D	PPARGC1A	Mitokondriyal biyogenez ve fonksiyon, insülin sekresyonunda azalma (Ling ve ark., 2008)
	Yaşlanma, T2D için genetik risk, prediyabet	CCND2, CILP2, FHL2, GNPAT1, HLF, KLF14, PBX4, SH2B3, SLC6A4, TCF7 ve ZNF518B	Mitokondriyal fonksiyon, değişmiş insülin sekresyonu ve glukoz homeostazı (Bacos ve ark., 2016)
Pankreas	T2D	853 gende farklı DNA metilasyonu, bunlardan 102'si T2D adacıklarında diferansiyel olarak ifade edilmiştir: örneğin, CDKN1A, PDE7B, SEPT9 ve EXOC3L2	Hücre döngüsü, β -hücre kütle genişlemesi, β -hücreleri ve α -hücreleri işlevi, glukagon ve insülin sekresyonu, glukoz homeostazı (Dayeh ve ark., 2014)
	Aşırı kilo, obezite ve T2D	ABCG1, SOCS3, SREBF1 ve TXNIP	Glukoz ve lipid homeostazı, HDL kaynaklı insülin sekresyonunda artış (Dayeh ve ark., 2016)
	T2D	PDX1, TCF7L2, ADCY5, NR4A3, PARK2, PID1, SLC2A2, SOCS2	β hücreli proliferasyon, mitokondriyal fonksiyon ve insülin sekresyonu (Volkov ve ark., 2017)

Metabolik bozukluğu olan hastalarda değişmiş DNA metilasyon profilleri tam kanda ve kan hücrelerinin alt tiplerinde (örneğin, lökositler, mononükleer hücreler ve CD4 + T hücreleri) tanımlanmıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Kan örneklerinde DNA metilasyonunun yeniden programlanması (Cheng ve ark., 2018; Wang ve ark., 2016; Arner ve ark., 2016'dan uyarlanmıştır)

Örnekler	Tıbbi durum	DNA metilasyonu ile yenidenprogramlanan genler	Fizyolojik veya patofizyolojik ilişki
Tam kan	Çocukluk çağı obezitesi ve kardiyometabolik hastalık riski	PPARGC1A	Mitokondrial biyogenez ve fonksiyon, adipozite (Clarke-Harris ve ark., 2014)
	Aşırı kilolu, T2D ve T2D'nin birinci derece ilişkisi	HIF3A	Glukoz ve amino asit metabolizması, apoptoz, proteoliz, p53 ve PPAR sinyalleme ve adiposit farklılaşması / adipozite (Dick ve ark., 2014)
	Aşırı kilo ve obezite	LEP ve ADIPOQ	Gıda alımı, aşılama, insülin duyarlılığı, glukoz ve lipid homeostazı, enerji dengesi (Houde ve ark., 2015)
	Aşırı kilo, obezite, T2D ve yaşlanma	FHL2, NOX4, ELOVL2, FHL2, KLF14 ve GLRA1	Yağ asidi metabolizması, mitokondriyal fonksiyon, oksidatif stres, kemokin sinyali (Ronn ve ark., 2015)
	Aşırı kilo, obezite ve T2D	ABCG1, PHOSPHO1, SOCS3, SREBF1, TXNIP	Besin algılama / metabolizma, redoks regülasyonu, insülin sekresyonu, mitokondriyal fonksiyon, oksidatif stres, lipid homeostazı (Dayeh ve ark., 2016)
	Obezite	FYN, PIWIL4 ve TAOK3	Adiposit proliferasyonu, farklılaşma ve yaşlanma, insülin sinyalizasyonu veya direnç, inflamasyonda, JNK-MAPK sinyalizasyonu, enerji harcaması (Huang ve ark., 2015)
	T2D	IGFBP-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü ile etkileşim, insülin direnci (Gu ve ark., 2015)
	Aşırı kilo, obezite, meme kanseri hastalarının kardeşleri	ANGPT4, RORC, SOCS3, FSD2, XYLT1, ABCG1, STK39, ASB2 ve CRHR2	İnflamatuar ve sitokin sinyalleşmesinde, anjiyogenez, lipid metabolizması, leptin direnci, hücrel stres (Wilson ve ark., 2017)
	Aşırı kilo, obezite, kardiyometabolik hastalık	BCG1, CPT1A, LGALS3BP, DHCR24, PHGDH, SARS, NOD2, CACNA2D3, HIF3A, SLC1A5 ve SREBF1	Enerji homeostazı (glikoliz, lipogenez, mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu), adipogenez, immün cevap, amino asit sentezi, kardiyak iletim (Mendelson ve ark., 2017)

Tablo 5. Kan örneklerinde DNA metilasyonunun yeniden programlanması (Cheng ve ark., 2018; Wang ve ark., 2016; Arner ve ark., 2016'dan uyarlanmıştır, Devam)

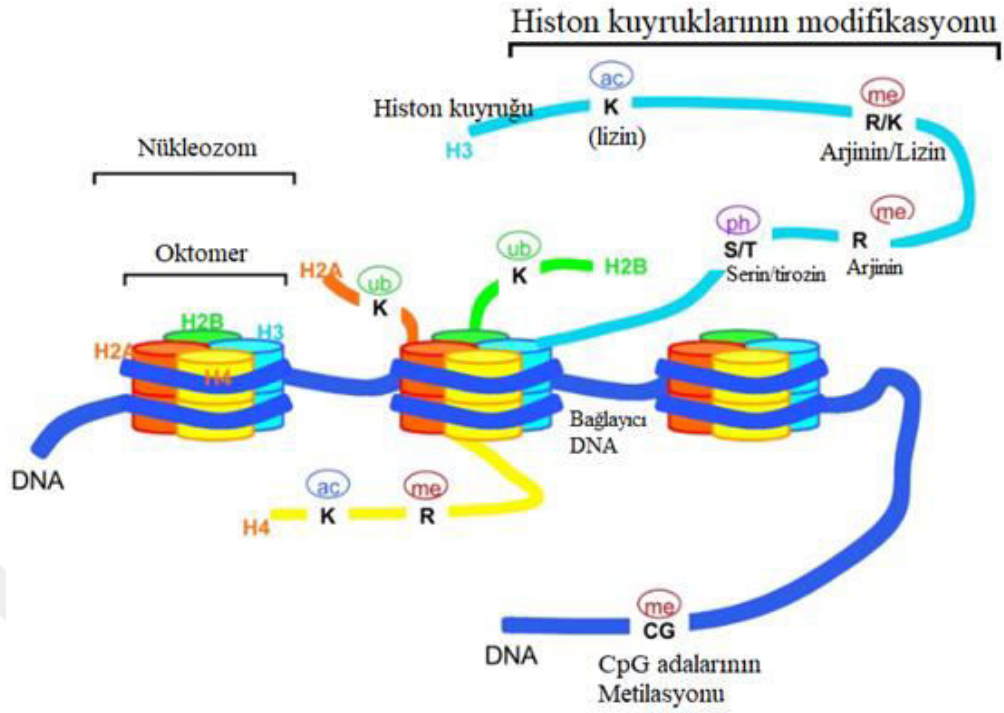
Örnekler	Tıbbi durum	DNA metilasyonu ile yenidenprogramlanan genler	Fizyolojik veya patofizyolojik ilişki
Tam kan	Kardiyometabolik hastalık	HIF3A, CPT1A ve ABCG1	Adipogenez, hipoksiye cevap, fosfolipidlerin taşınması, glukoz, insülin, lipid homeostazı (Demeraht ve ark., 2015)
	T2D	TXNIP, ABCG1 ve SAMD12	Redoks regülasyonu, glukoz metabolizması, lipid homeostazı (Kulkarni ve ark., 2015)
	T2D ve kardiyometabolik hastalık	CPT1A ve ABCG1	Mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu, ve fosfolipidlerin taşınması ve lipid homeostazı (Mamtani ve ark., 2016)
	T2D	CPT1A, DQX1, SREBF1, SBNO2, PRR5L, LY6G6E,	Yağ asitlerinin mitokondriyal alımı, trigliserit metabolizması, kolesterol homeostazı (Al Muftah ve ark., 2016)
	Obezite ve prediyabet	MT-ND6 ve D-loop	Mitokondrial replikasyon ve fonksiyon (Zheng ve ark., 2015)
	Adipozite ile ilişkili metabolik özellikler ve T2D	ABCG1, LPIN1, HOXA5, LMNA, CPT1A,SOCS3	Yağ asitlerinin mitokondriyal alımı, , inflamatuvar ve sitokin sinyalleşmesinde (Wahl ve ark., 2017)
	Obezite	HIF3A	Hipoksiye yanıt, adipoz farklılaşması, kc hastalıkları (Wang ve ark., 2015)
Periferik kan lökositleri	Obezite	CPT1A, SREBF1, ABCG1, ARID1B	Mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu, trigliserit metabolizması, fosfolipid taşınımı (Wang ve ark., 2016)
Periferik kan mononükleer hücreleri	Obezite	SOCS3	Sitokin sinyalizasyonu, inflamasyon, enerji dengesi düzenlenmesi (Ali ve ark., 2016)
CD4 + T hücreleri	Kardiyometabolik hastalık	HIF3A, CPT1A ve ABCG1	Adipogenez, hipoksiye cevap, makrofaj kolesterol ve fosfolipidlerin taşınması, (Arner ve ark., 2016)
CD4 + T hücreleri	Kardiyometabolik hastalık	CPT1A, PHGDH, CD38	Yağ asitlerinin mitokondrial alımı, hücrel gelişim, immünoloji (Irvin ve ark., 2014)

Metaller ya da aromatik hidrokarbonlar gibi çevresel ajanlar da genomu destabilize ederek ya da hücre metabolizmasını etkileyerek epigenetik paternlerde değişikliklere neden olabilir. Fetal veya yenidoğan döneminde bisphenol A gibi DNA hipometilleyici bir maddeye maruz kalındığında vücut ağırlığının arttığı gözlenmiştir (Güçlü-Geyik ve Erginel-Ünaltuna, 2013).

2.7.2. Histon Modifikasyonları

DNA, histon proteinleri ile sarılarak paketlenmektedir. Her oktamer, H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının her birinden iki kopya içerir. Kromatinin temel birimi olan histon oktameri, çekirdek etrafında paketlenmiş yaklaşık 147 DNA baz çifti bulunduran nükleozomu oluşturur. Biraraya gelen bu protein–DNA kompleksleri kendi etrafında sarılarak kromozomları meydana getirirler (Can ve Aslan, 2016). Kromatin, gen transkripsiyonuna izin vermeyen, inaktif, yoğunlaşmış bir bölge (heterokromatin) ve genlerin transkribe olmasına izin veren, aktif olan, açık bir bölge (ökromatin)’den meydana gelir. Histonlar, ökaryotik kromatinde ilk düzeyde DNA paketlenmesinden sorumludurlar. Histonlar, DNA’dan yalnızca DNA replikasyonu sırasında geçici olarak ayrılır ve transkripsiyon sırasında DNA ile birlikte kalırlar (Nestler, 2014).

Histon modifikasyonları, kromatin ile ilişkili proteinler ile gen ifadesinin post-translasyonel olarak değişimidir. Lizin ve arjinin kalıntılarının metilasyonu, lizin asetilasyonu, serin ve treonin kalıntılarının fosforilasyonu, prolin izomerizasyonu, monoubikitinasyon, sumolasyon bunlar evrimsel süreçte korunan histon modifikasyonları olarak bilinir (Zhang 2007, şekil 3).



Şekil 3. Histon modifikasyonları, ub: ubikitinasyon, ph: fosforilasyon, me: metilasyon, ac: asetilasyon (Romania ve ark, 2012'den uyarlanmıştır)

Asetilasyon: Histon modifikasyonları, nükleozomun dış kısmındaki, amino terminal uçtaki, histon kuyruklarına asetil, metil ve fosfor gruplarının eklenmesiyle meydana gelir. Çalışmalarda, histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin asetilasyon olaylarında önemli rol oynadığı görülmüştür (Küçüköğlu, 2013).

Histon kuyruklarında bulunan lizin aminoasitlerine HAT enzimleri tarafından negatif yüklü asetil grubunun bağlanmasıyla histon ve DNA arasındaki sıkı bağlantı azalır. Böylece transkripsiyon sürecinde RNA polimeraz ve transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanması sağlanır ve gen aktivasyonu gerçekleşir. HDAC enzimi, asetil grubunu lizin aminoasitlerinden ayırarak kromatin inaktivasyonuna sebep olarak transkripsiyonu baskılar (Küçüköğlu, 2013, Narlıkar ve ark., 2002). Asetilasyon hep aynı aminoasitlerden gerçekleşir. H3 özellikle 9, 14, 18 ve 23., H4 ise 5, 8, 12 ve 16. pozisyonlardaki lizin aminoasitlerinden asetillenir (Küçüköğlu, 2013).

Metilasyon: Histon metilasyonu, histon metiltransferaz enzimlerinin histon proteinlerinde bulunan aminoasitlere metil grubu eklenmesi ile gerçekleşir. 1, 2 ya da 3 metil grubu eklenebilir (tri-metilasyon). Genlerin açık/kapalı olması bulunduğu hücre

tipine göre farklılıklar gösterir. Histon 3 kuyruğundaki metilasyonun epigenetik düzenlemede önemli görevi vardır. Ökaryotlarda promotör bölgelerini Histon 3 lizin 4 (H3K4) tri-metilasyonu belirlemektedir (İzmirli, 2013).

Fosforilasyon: Histon deasetilazlara fosfat gruplarının eklenmesi ile olur. Bu durum geri dönüşümlüdür. HDAC'lara serin, treonin ve tirozin rezidülerinden fosfat bağlanır. Fosforilasyon, protein kinazlar ve protein fosfatazlar tarafından meydana gelir (Ford ve ark., 2007).

S-nitrasilasyon: HDAC'lara sistein rezidüsünden nitrosil grubunun bağlanması ile meydana gelir. Kromatinden korepresörler ayrılmaz (Nott ve ark., 2008).

Ubukitinasyon: Lizin rezidüsüne küçük bir protein olan ubikitin bağlanır. E1, E2, E3 enzimleri ile enzimatik bir reaksiyon gerçekleştirilir ve protein degregasyonu gerçekleşir (İzmirli, 2013).

Sumolasyon: Ubukutine benzer bir protein olan SUMO 1,2,3, proteinleri lizin rezidülerinden proteinlere bağlanır ve protein degradasyonu önlenmiş olur (Yang ve ark., 2007).

Histon modifikasyonlarının obezite epigenetiğindeki rolüne örnek olarak; adiposit oluşumunda görev alan genlerin aktivitesini düzenleyen PPAR γ transkripsiyon faktörüne etkisi gösterilebilir. PPAR γ , H4K20 (histon H4 lizin 20) monoaçiltransferaz PR-Set7/Setd8 transkripsiyonunu artırır. Bu yoldan geri bildirim ile PPAR γ ve birçok hedef faktör aktivitesi tetiklenir. Böylece adipogenez artar (Usanma ve ark., 2017).

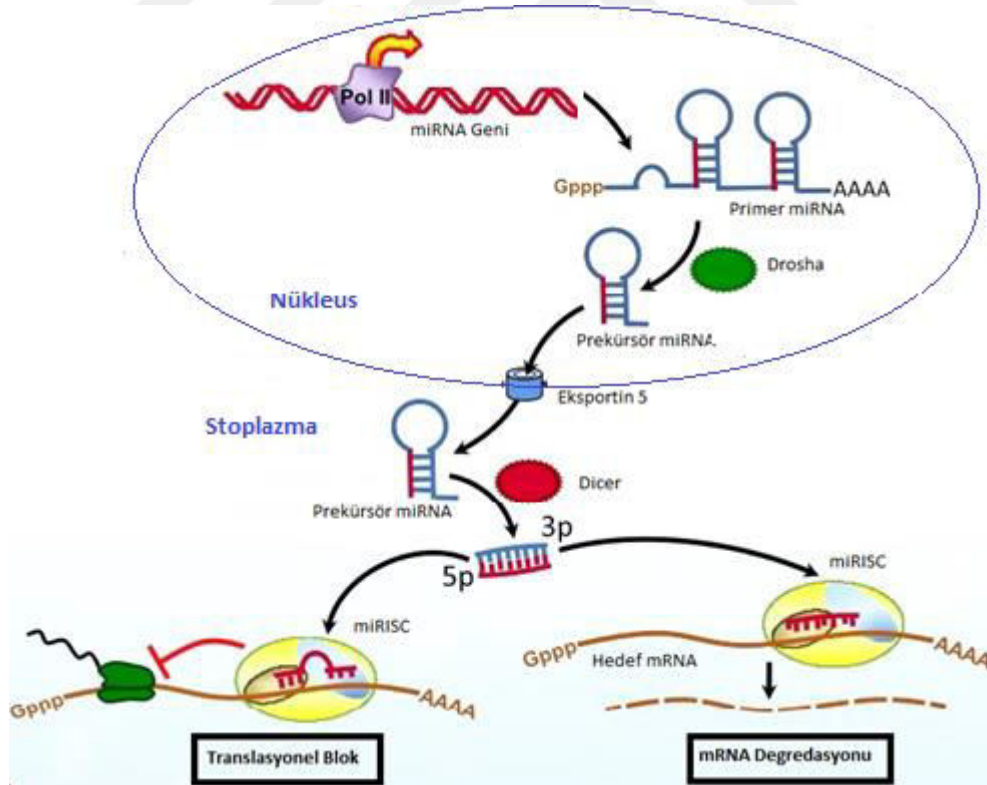
Enerji kısıtlaması ile histon modifikasyonlarında değişiklik gözlenmiştir. GLUT4 geninde yapılan kromatin immunopresitasyon analizinin neticesinde kalori kısıtlaması ile beslenen farelerin adipoz dokularında histon 4 asetilasyonun arttığı bildirilmiştir (Wheatley ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada çizgili kas dokusunda C/EBP β (CCAAT/ arttırıcı bağlayıcı protein) ve GLUT4 (glukoz taşıyıcı tip 4) genlerinin promotör bölgelerinde histon 3 ve 4 asetillenmesinde artış gözlenmiştir (Zheng ve ark., 2011).

2.7.3. Mikro RNA

MiRNA'lar kısa, 18-25 nükleotid uzunluğunda, kodlanmayan ve genlerin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde görevli RNA molekülleridir (Flowers ve ark., 2013). MiRNA biyogenezi, çekirdekte RNA polimeraz II aracılığında transkripsiyon ile

başlar ve saç tokası yapısında olgun miRNA dizisini içeren uzun primer miRNA (pri-miRNA) meydana gelir (Hitit ve ark., 2015). Hairpin yapısı, Drosha (RNAaz III enzimi) ve kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8)'den (Pasha) oluşan mikroprosesör tarafından kesilir ve 60-70 nükleotid uzunluğunda prekürsör miRNA'nın (pre-miRNA) oluşmasını sağlar (Hitit ve ark., 2015). Pre-miRNA nükleustan Exportin-5 (XPO5) ile sitoplazmaya taşınır ve diğer bir RNAaz III enzimi olan Dicer tarafından 21-24 nükleotid uzunluğunda dubleks miRNA'ya kesilir (Hitit ve ark., 2015). Olgun diziye kesilecek olan iplik, miRNA indüklenmiş susturma kompleksini (RISC) oluşturan Argonat'a yüklenir. Eksik baz eşleşmesiyle, miRNA RISC'i indükler ve mRNA destabilizasyonu ya da translasyonel baskılanmaya neden olur (Hitit ve ark., 2015).

MiRNA'lar mRNA'nın translasyona uğramayan 3' bölgesine (3'UTR) bağlanarak translasyonun baskılanması, genlerin deadenilasyonu ve baskılanmasına yol açarak hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol eder (Mcgregor ve Choi, 2011, Şekil 4).



Şekil 4. MiRNA biyogenezi ve gen susturma mekanizması (Comer ve ark., 2015'den uyarlanmıştır)

Adipoz doku ve miRNA'lar

MiRNA'lar adipoz dokuda çok çeşitli metabolik yolları kontrol ederek enerji dengesi ve metabolik homeostazın düzenlenmesine katkıda bulunabilir. miRNA'ların yağ hücrelerinin düzenlenmesindeki rolünü öne süren ilk kanıt *Drosophila*'dır, bu çalışma miR-14'ün p38 ve MAPK'yı hedef alarak yağ metabolizması üzerinde baskılayıcı bir etki yaptığını göstermektedir. Daha sonra, hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda adiposit farklılaşmasına, β -hücre kütlelerinin kontrolüne ve insülin sinyal yolağına odaklanarak glikoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde yer alan çok çeşitli miRNA'lar tanımlandı. Bildirilen bazı miRNA'ların farklı mekanizmalarla adipogenezi desteklediği, bazılarının da adiposit farklılaşmasına müdahale ettiği bildirilmiştir. Beyaz adipoz doku, iştah düzenlemesi ve insülin duyarlılığı ile bağlantılı olan, leptin gibi klasik hormonlar, IGF-1 ve PDGF (Platelet kaynaklı büyüme faktörü) gibi büyüme faktörleri ve IL-6, IL-8 gibi sitokinler veya TNF α gibi inflamatuvar aracı maddeler olarak etki gösteren farklı yüzlerce faktörün ve adipokinler gibi sinyal moleküllerinin salınımı ile metabolik fonksiyonları gerçekleştirir (Fischer-Posovszky ve ark., 2016). Kronik düşük dereceli inflamasyonun, adipoz doku, karaciğer, kas ve vasküler sistemi içeren hedef organlarda insülin direncinin oluşumuna katkıda bulunan obezitenin temel bir özelliği olduğu fikri desteklemektedir (Jung ve Choi, 2014). Lipidler ve glikoz gibi besin maddelerinin fazlası, aynı zamanda, metabolik fonksiyonu daha da bozan, stres ve inflamasyonu artıran inflamatuvar tepkileri tetikleyebilir. Buna göre, beslenme-bağışıklık teorisine göre, yağ dokusunda, aşırı beslenmeye bağlı obezite, düşük seviyeli inflamatuvar süreçleri tetikler (Wellen ve Hotamisligil, 2005).

Adipoz doku subklinik kronik inflamasyon durumunda kaldığı için anormal yağ birikiminin patojenik riskleri arttırdığı gösterilmiştir (Kammoun ve ark., 2014). Makrofajların alımı ve artan immün hücre proliferasyon aktivasyonu-infiltrasyonu adiposit hipertrofisine ve bozulmuş adipogeneze bağlıdır (Kraakman ve ark., 2014). Sonraki işlemler hücre içi transkripsiyon faktörleri, hücre dışı dolaşımdaki hormonlar ve gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel ek regülatörleri dahil olmak üzere düzenleyici sinyaller ile sıkı bir şekilde kontrol edilir (Tang ve Lane, 2012).

Adipogeneze, fibroblast benzeri pre-adipositlerin olgun adipositlerde farklılaştığı, hücre bağlantıları, klonal genişleme ve terminal farklılaşmayı içeren karmaşık bir süreçtir (Ali ve ark., 2013). Daha ayrıntılı olarak, pre-adipositlerden olgun

adipositlere farklılaşmayı düzenleyen anahtar adım adiposit fenotipleri için gerekli olan genlerin ekspresyonunu koordineli olarak kontrol eden C/EBP'ler ve PPAR gibi birkaç transkripsiyon faktörü ile yönetilir. C/EBP β ve C/EBP δ adipojenik uyarıcılar tarafından indüklenir ve adipogenezisin birincil düzenleyicilerini temsil eder. C/EBP β ve C/EBP δ hedefleri C/EBP α ve PPAR γ yanı sıra, lipojenik genlerin ana düzenleyicisi olan sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (SREBP1) gibi faktörler kritik adipojenik faktörleri kodlayan genlerin düzenleyicileridir. C/EBP α intronsuz genin kodladığı protein bir homodimer olarak belirli promotörlere ve arttırıcılara bağlanabilen veya ilgili proteinleri C/EBP β ve C/EBP γ ile heterodimerler oluşturabilen lösin fermuar transkripsiyon faktörüdür. C/EBP α proteininin promotere bağlandığı aynı zamanda vücut ağırlığı homeostazında merkezi bir rol oynayan leptin geninin ekspresyonunu değiştirdiği gösterilmiştir (Lacomino ve Siani, 2017). C/EBP α , preadipositlerin olgun adipositlere farklılaşmasını tetiklemek için yeterlidir (Linhart ve ark., 2001). Özellikle, PPAR γ , endojen C/EBP α transkripsiyonunu doğrudan tetikler. Sırayla, C/EBP α PPAR γ genini pozitif geri besleme döngüsü yoluyla aktive eder, böylece adipogenezini teşvik eder (Tang ve Lane, 2012). Birlikte, PPAR γ ve C/EBP α , insülin duyarlılığında, lipogenezde, lipolizde, adipositlerin farklılaşmasında ve olgun fonksiyonlarında rol oynayan genlerin ekspresyonunu teşvik eder. Preadipositlerden miRNA ekspresyonu obezite ve yağ hücre gelişimi süresince değişir. Adipogenezini düzenleyen miRNA'lar tablo 6'da ve anti-adipojenik miRNA'lar tablo 7'de gösterilmektedir. Adipoz hücre bağlantısını ve farklılaşmasını düzenleyen karmaşık olaylar dizisi aynı zamanda Wnt, BMP (kemik morfogenetik protein), TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü beta) ve hedgehog tarafından kontrol edilen anti-adipogenik sinyal kaskadını da içerir (Moseti ve ark., 2016). Beklendiği gibi, adipositlerin boyutunda (hipertrofi) ve sayısında (hiperplazi) artış yağ kütlesinin daha da artmasına ve yağ dokusunda enerji depolanmasına, muhtemelen obezite riskinde artışa neden olabilir.

Trigliseritlerin depo yeri olan adipositler, enerji homeostazisinin düzenlendiği endokrin bir organ olarak kabul edilmektedir (Lacomino ve Siani, 2017). Bu durumda, miRNA'ların çok çeşitli metabolik yolları kontrol ederek enerji dengesi ve metabolik homeostazın düzenlenmesine katkıda bulunmaları şaşırtıcı değildir. Obezite ile ilgili miRNA'lar obeziteye karşı ilaçlar için yeni tedavi hedefleri sağlar (Mcgregor ve Choi, 2011). miRNA'lar lipoprotein sentezi, revers kolesterol transportu ve insülin sinyalinde

mRNA translasyonunu etkileyen mekanizmaları düzenleyerek etki ederler. miRNA'lar adipoz doku farklılaşması, proliferasyonu, glukoz ve lipid metabolizmasında rol alırlar (Flowers ve ark., 2013).

Tablo 6. Adipogenezi düzenleyen miRNA'lar (Lacomina ve Siana, 2017; Thompson ve ark., 2017; Ortega ve ark., 2013'den uyarlanmıştır)

miRNA	Hedef/ Süreç	Kaynak
<i>miR-17</i>	Rb2/p130	Wang ve ark., 2008
<i>miR-21</i>	TGF- β sinyal yolu	Kim ve ark., 2008
<i>miR-26b</i>	PTEN'i inhibe ederek adipojenik farklılaşma. Viseral adipoz dokuda seviyeler azalır	Li ve ark., 2017
<i>miR-30</i>	Osteogenezisin temel bir düzenleyicisi olan RUNX2'nin modülasyonu	Zaragosi ve ark., 2011
<i>miR-103</i>	MEF2D. AKT / mTOR sinyal yolu	Li ve ark., 2015
<i>miR-143</i>	MAPK sinyal yolu. Glikoz homeostazı	Esau ve ark., 2004
<i>miR-146b</i>	FOXO1'in SIRT1'in neden olduğu deasetilasyonu	Chen ve ark., 2014
<i>miR-148a</i>	Wnt sinyal yolu	Shi ve ark., 2015
<i>miR-181</i>	TNF- α	Li ve ark., 2013
<i>miR-199a</i>	Smad1	Shi ve ark., 2014
<i>miR-204</i>	Runx2	Huang ve ark., 2010
<i>miR-210</i>	Wnt	Qin ve ark., 2010
<i>miR-320</i>	RUNX2	Hamam ve ak., 2014
<i>miR-371</i>	Epigenetik değişiklikler. Adipogenik farklılaşma	Bork ve ark., 2011
<i>miR-375</i>	ERK1/2 sinyal yolu	Ling ve ark., 2011
<i>miR-378</i>	Adiposit gelişimi ve farklılaşması	Gerin ve ark., 2010
<i>miR-637</i>	Sp7	Zhang ve ark., 2011

Tablo 7. Anti- adipojenik miRNA'lar (Lacomina ve Siana, 2017; Thompson ve ark., 2017; Ortega ve ark., 2013'den uyarlanmıştır)

miRNA	Hedef/ Süreç	Kaynak
<i>let-7</i>	FABP4 ve PPAR γ sinyal yolu. HMGA2 üzerinden klonal genişlemeyi önler	Sun ve ark., 2009
<i>miR-15a</i>	Delta-like 1 homolog	Andersen ve ark., 2010
<i>miR-22</i>	HDAC6	Huang ve ark., 2012
<i>miR-27a/b</i>	MAPK / ERK, PHB, C / EBP β , PPAR γ ve aP2 sinyalleriyle sinyal gönderir. Lipid birikimini azaltır	Qin ve ark., 2010
<i>miR-31</i>	C / EBP α sinyali.	Tang ve ark., 2009
<i>miR-33b</i>	C / EBP α ve PPAR γ sinyalini hedef EBF1 ile lipogenezi azaltır	Taniguchi ve ark., 2014
<i>miR-93</i>	Sirt7 ve Tbx3	Cioffi ve ark., 2015
<i>miR-125a</i>	ERR α	Ji ve ark., 2014
<i>miR-130</i>	PPAR γ inhibe edilerek adipogenezisin inhibisyonu	Lee ve ark., 2011
<i>miR-138</i>	Adiposit farklılaşmasının EID-1 ile inhibisyonu. Lipit damlacık azaltma	Yang ve ark., 2011
<i>miR-145</i>	IRS1'i hedefleyerek preadiposit farklılaşması	Guo ve ark., 2012
<i>miR-155</i>	C / EBP β yolu	Skarn ve ark., 2012
<i>mirR-193a/b</i>	Adipoz dokusunda adiponektin üretimi. Kahverengi adipositlerde myoblast farklılaşmasını indüklenmesi	Belarbi ve ark., 2015
<i>miR-194</i>	Osteogenezi uyarır ve COUP-TFII ile adipogenezi inhibe eder	Jeong ve ark., 2015
<i>miR-221</i>	Adiponektin sinyali	Skarn ve ark., 2012
<i>miR-222</i>	Glikoz metabolizması.	Skarn ve ark., 2012
<i>miR-224</i>	EGR2. Yağ asidi metabolizması	Peng ve ark., 2013
<i>miR-344</i>	GSK3 β , Wnt / β -catenin sinyal yolunu aktive eder.	Qin ve ark., 2010
<i>miR-363</i>	E2F3'ü hedefleyerek adiposit farklılaşmasını önler. C / EBP α ve PPAR γ 'yı düşürür	Chen ve ark., 2014
<i>miR-365</i>	Kahverengi yağ farklılaşması	Sun ve ark., 2011
<i>miR-369</i>	FABP4. Adipojenik farklılaşma	Bork ve ark., 2011
<i>miR-448</i>	KLF5. Serotonin reseptörleri 5-HT2AR ve 5-HT2CR'nin aktivasyonu	Kinoshita ve ark., 2010
<i>miR-709</i>	Wnt / β -catenin sinyalinin GSK3 β 'si	Chen ve ark., 2014

Dolaşımdaki miRNA'lar

Her ne kadar miRNA'lar ilk önce hücre içinde tanımlansa da, daha sonraki çalışmalarda plazma, serum, idrar ve tükürük gibi diğer vücut sıvılarında yüksek konsantrasyonda ve artan sayıda miRNA bulunmuştur (Turchinovich ve ark., 2011). Nükleazların her yerde olabilmesine rağmen miRNA'ların kan ve vücut sıvılarında stabil olabileceği kavramı başlangıçta şüpheyle karşılanmıştır (Cortez ve Calin, 2009). Hücre içermeyen miRNA ekspresyonu çeşitli hastalıklar için erken teşhis araçları olarak invazif olmayan biyobelirteçler olarak kullanılabilme olasılığı büyük ilgi yaratmıştır (Kim, 2015). Erişilebilirliklerinden dolayı, araştırılan en yaygın miRNA kaynakları tam kan, serum ve plazmadır (Grasedieck ve ark., 2013). Beklendiği gibi dolaşımdaki miRNA'lar (cmiRNA'lar) çıplak moleküller değildir ve iki ana mekanizma onları nükleaz faaliyetlerinden korumak için tanımlanmıştır. Birincisi, yüksek yoğunluklu lipoproteinlerle RNA susturma kompleksinde yer alan bir protein olan Argonaute 2 (AGO-2) veya ribozomun nükleer taşınmasında yer alan bir nükleolar RNA-bağlayıcı protein olan nükleofosmin-1 (NPM-1) gibi spesifik bağlayıcı protein komplekslerinden oluşur (Wang ve ark., 2010; Arroyo ve ark., 2011, Vickers ve ark., 2011). İkinci mekanizma dolaşımdaki mikrovezikül yada endozomal kompartmandan veya hücre plazma zarından türetilen eksozomlar içine alınmış cmiRNA'ların keşfinden kaynaklanmaktadır (Camussi ve ark., 2011; Mittelbrunn ve ark., 2011). Hücrelerden miRNA'ların serbest bırakılması için gerekli mekanizma çok bilinmemesine rağmen eksozomlar veya protein kompleksleriyle düzenlenmiş hücre dışı miRNA'lar hedef gen translasyon kontrolüne katılabilen alıcı hücrelere iletilebilirler (Weber ve ark., 2010). Bununla birlikte, dolaşımdaki miRNA'ların fizyolojik rolü hala belirsizdir. Obezite ve TD2 olan bireylerde farklı cmiRNA profilleri bildirilmiştir (Guay ve ark., 2013). Tablo 8' de belirli cmiRNA'ların farklı metabolik hastalıklardaki rolü özetlenmektedir.

Tablo 8. Obezite ve metabolik hastalıklar ile bağlantılı dolaşımdaki miRNA'lar (Lacomina ve Siana, 2017; Thompson ve ark., 2017; Ortega ve ark., 2013'den uyarlanmıştır)

miRNA	Süreç	Kaynak
↓miR-126	T2D	Zampetaki ve ark., 2010
↑miR-1, miR-21, miR-133a, miR-208	Miyokardiyal enfarktüs	Zile ve ark., 2011
↑miR-122	Hepatik hasar ve steatoz	Cermelli ve ark., 2011
↑let-7e	Hipertansiyon	Li ve ark., 2011
↑miR-130a miR-195	Yüksek kan basıncı	Karolina ve ark., 2012
miR-23a, miR-27a, miR-130, miR-195, miR-197, miR-320a, miR-509-5p	Metabolik sendrom	Deiuliis, 2016
↑let-7g ve miR-221	Kadınlara özgü-Metabolik sendromda	Wang ve ark., 2013
let-7b, miR-143, ve miR-221	Aterojenik ve adipojenik işlemler	Hulsmans ve ark., 2011
↓miR-17-5p ve miR-132	Obezite	Heneghan ve ark., 2011
↓miR-122, miR-324-3p, miR-375, miR-652; ↑miR-625	Gebelik öncesi ve gebelikteki obezite	Heneghan ve ark., 2011
↑miR-140-5p, miR-142-3p, miR-222; ↓miR-532-5p, miR-125b, miR-130b, miR-221, miR-15a, miR-423-5p, miR-520c-3p	Morbid obez hastalar	Ortega ve ark., 2013
↓miR-17-5p	Koroner arter hastalığı	Chen ve ark., 2015
↑miR-33	Ailesel hiperkolesterolemi ve kardiyometabolik bozukluklar	Rotllan ve ark., 2016
↑miR-122	NAFLD. İnsülin direnci, obezite, metabolik sendrom, tip 2 diyabet	Willeit ve ark., 2017
↑miR-122 ve miR-199a	Çocukluk çağı obezitesi	Thompson ve ark., 2017
↓miR-375	T1D başlangıcı	Marchand ve ark., 2016

2.7.4. Long-noncoding RNA'lar (lncRNA)

Uzun kodlamayan RNA'lar en az 200 nükleotidin kodlayıcı olmayan RNA'ları olarak tanımlanır (Yu ve ark., 2017). lncRNA'lar telomer homeostazı ve kromozom

replikasyonu, nükleer yapının kontrolü ve translasyonu, X-kromozomu inaktivasyonu, epigenetik modifikasyonların düzenlenmesi, mRNA'nın kontrolü, protein stabilitesi ve miRNA aktivitesinin düzenlenmesi gibi birçok biyolojik süreçte kritik bir rol oynamaktadır (Yu ve ark., 2017). Zayıf ve obez domuz adipoz dokularında lncRNA ve mRNA moleküllerinin ekspresyonu incelenmiş ve obezite gelişiminde lncRNA'ların potansiyel düzenleyici etkisi gözlenmiştir (Yu ve ark., 2017).

2.8. Obezite Tedavi Yöntemleri

Halk sağlığı genel müdürlüğünden (HSGM) verilen bilgilere göre çocuk ve adolesan döneminde oluşan obezite, yetişkinlik dönemi obezitesi için zemin oluşturmaktadır. Obezite tedavisi, bireyin kararlılığı ve etkin olarak katılımını gerektiren, tedavisi zorlu, uzun ve süreklilik gerektiren bir süreçtir. Obezitenin etiyolojisinde pek çok faktörün etkili olması, bu hastalığın önlenmesi ve tedavisini son derece güç ve karmaşık hale getirmektedir. Obezite tedavisinde amaç, gerçekçi bir vücut ağırlığı kaybı hedeflenerek, obeziteye ilişkin morbidite ve mortalite risklerini azaltmak, bireye yeterli ve dengeli beslenme alışkanlığı kazandırmak ve yaşam kalitesini arttırmaktır. 6 ayda vücut ağırlığının %10 azalması, obezitenin yol açtığı sağlık sorunlarının önlenmesinde önemli fayda sağlamaktadır (HSGM, 2017).

Obezite tedavisinde kullanılan yöntemler 5 grup altında toplanmaktadır;

1. Tıbbi Beslenme (Diyet) Tedavisi

Vücut ağırlığının, boya göre olması gereken düzeye indirilmesi amaçlanır. Diyet tedavisinin bireye özgü olduğu unutulmamalıdır. Başlangıçta belirlenen hedefler, bireyin olması gereken ideal ağırlığı olabildiği gibi, ideal ağırlığının biraz üzerinde de olabilir. Uygulanacak zayıflama diyetleri yeterli ve dengeli beslenme ilkeleri ile uyumlu olmalıdır. Amaç, bireye doğru beslenme alışkanlığı kazandırılması ve bu alışkanlığını sürdürmesidir. Vücut ağırlığı boya göre olması gereken düzeye geldiğinde tekrar ağırlık kazanımı önlenmeli ve kaybedilen ağırlık korunmalıdır (HSGM, 2017).

Çocuklarda dengeli ve az kalorili diyet uygulanır. Normal kalori gereksinimi %30-40 oranında azaltılır. Diyet %25-30 oranında yağ, %50-55 oranında kompleks karbonhidrat ve %20-25 oranında protein içermelidir. Toplam kalori 5-8 öğüne bölünerek verilmelidir. Bu diyet 5 yaş ve üstü çocuklarda güvenle uygulanır ve haftada 0.5 kg verilmesi amaçlanır. Diyet ile yavaş bir biçimde kilo verilmesi, kilo kazanımı

olmaksızın boy uzamasının sürdürülmesi, diyet, egzersiz ve yeme davranışlarının değiştirilmesi, ailenin tedavi sürecine katılımı ve obezitenin yinelenmesinin önlenmesi sağlanmalıdır (Babaoğlu ve Hatun, 2002).

2. Egzersiz Tedavisi

Egzersiz tedavisinin ağırlık kaybını sağlamadaki etkisi halen tartışmalı olsa da, fiziksel aktivitenin yağ dokusu ve karın bölgesindeki yağlanmayı azalttığı, diyet yapıldığında görülebilen kas kütle kayıplarını önlediği kesin olarak kabul edilmektedir. Egzersiz tedavisi ile tıbbi beslenme tedavisini destekleyici nitelikte bireylerin ağırlık kazanımları engellenebilmekte, zayıflama ve tekrar ağırlık kazanmanın önlenmesi sağlanmaktadır (HSGM, 2017).

3. Davranış Değişikliği Tedavisi

Vücut ağırlığının denetiminde davranış değişikliği tedavisi, fazla ağırlık kazanımına neden olan yemek yeme ve fiziksel aktivite ile ilgili olumsuz davranışları olumlu yönde değiştirmeyi veya azaltmayı, olumlu davranışları ise pekiştirerek yaşam biçimi haline gelmesini amaçlayan bir tedavi şeklidir. Davranışsal yaklaşımların temelinde bireyin kendini disipline sokması yatar. Yine davranışsal yaklaşımların en önemli amaçlarından birisi düzenli fiziksel aktivite alışkanlıklarının hastalara kazandırılmasıdır (Babaoğlu ve Hatun, 2002; HSGM, 2017).

4. Farmakolojik Tedavi

Obezite tedavisinde kullanılacak ilaçlar hafif ve orta derecede ağırlık fazlalığı olan bireyler için uygun değildir. Kullanılan ilaçların, sağlık yönünden güvenirliliğinin saptanmış olması, obeziteye neden olan etiyolojiye uygun bir etki göstermesi, kısa ve uzun dönemde önemli yan etkisinin olmaması ve bağımlılık yapmaması ve bu tür ilaçların mutlaka hekim tavsiyesi ve kontrolünde kullanılması gerekliliği büyük önem taşımaktadır.

Fenfluramin ve deksfenfluramin kardiyak yan etkileri nedeni ile 1997 yılında kullanımından vazgeçilmiştir. Sibutramin santral etkiyle (norepinefrin, serotonin ve dopamin geri alım inhibitörü) besin alımını azaltır. Sempatomimetik özelliklerine bağlı yan etkileri (ağız kuruluğu, asteni, kan basıncı ve kalp hızında hafif artış) vardır (Göktaş, 2014). Orlistat pankreatik lipazı bloke eder ve trigliserid sindirimini azaltır. Yağda eriyen vitamin emiliminde bozulmaya neden olur. Efedrin özellikle kafeinle birlikte kullanıldığında kilo verilmesini sağlayan termojenik bir ajandır. Bu

kombinasyon yağ asitlerinin oksidasyonunu artırıp besin alımını azaltarak yağsız kitle kaybını en aza indirir (Göktaş, 2014). Onbeş obez adolesan ile yapılan bir çalışmada hastalar kontrol grubuna göre vücut ağırlığında ve VKİ’inde anlamlı bir azalma saptanmakla birlikte kullanımını gastrointestinal etkilerin sınırlandırdığından bahsedilmektedir (Özkan ve ark., 2004). Özellikle hiperinsülinemi ve insülin direnci olan obez çocuklarda metformin tedavisiyle başarılı sonuçlar alınmıştır. Metformin karaciğer glukoz üretimini bloke eder ve dokuların insüline duyarlılığını artırır (Kay ve ark., 2001). Klinik deneyleri sürdürülen diğer ilaçların arasında hipotalamikobezite sendromu olan çocuk ve adolesanlarda kullanılan octreotid, bilinen bir sendromu olmayan çocuklarda orlistat, sibutramine ve metformin hala araştırılmaktadır (Yanovsky, 2001).

Obezite tedavisinin başarılı olması için hastanın ilaç tedavisinin yanı sıra tıbbi beslenme tedavisi ve egzersiz tedavisini sürdürmeyi kabul etmesi ve düzenli olarak kontrol olması gerekmektedir.

5. Cerrahi Tedavi

Cerrahi tedaviler çocuklarda önerilmemektedir (Babaoğlu ve Hatun, 2002).

2.9. Obezitede Gen Terapisi

Gen ürününü arttırıp azaltarak, lipoliz ve enerji harcanımına yardım etmesi neticesinde vücutta yağ azalması ve dolayısıyla kilo kaybını amaçlar. Enerji dengesi ve devamlılığını hedefler. Obeziteyi önleme ve tedavisini amaçlayan gen terapi çalışmaları mevcuttur (Tablo 9, Gao ve ark., 2014). Genetik defektin tanımlandığı obezite durumunda, hastalıklı hücreler için fonksiyonel bir genin kopyasının transferi, gen terapisi uygulanabilen monogenik hastalıklarda tedavi sağlayacaktır (Gao ve ark., 2014). Yapılan çalışmalar; obez farelere BDNF, İrisin yada FGF21 gen transferi ; yağ kütlesinin azaltılması ve karaciğer yağlanması (KC) ve insülin direncinin azalmasında etkisini göstererek metabolik hemostazın yeniden oluşturulması ve devam etmesinde gen terapisini destekleyen bir kanıt oluşturmaktadır (Gao ve ark., 2014). Exendin-4 adiptonektin, IL-10 gibi anti-inflamatuar bir sitokin ve leptin geni transferi hayvan modellerinde diyet kaynaklı obezitenin bloke edilmesinde oldukça etkilidir. FGF-21 geninin hidrodinamik dağıtımı, adipoz dokuda termogenezi arttırır ve KC de de novo lipogenezi baskılar. Dolayısıyla HFD (yüksek yağlı diyet) ile beslenen farelerde;

adipositte azalma, KC yağlanması hafifletilmesi, glikoz hemostazında iyileşmeyi içeren birçok faydalı metabolik etkilere yol açar (Gao ve ark., 2014). Gen terapi çalışmaları obezitenin ve obeziteye bağlı hastalıkların başarılı tedavisi için yeni stratejilerin geliştirilmesini amaçlar.

Tablo 9. Obezitenin önlenmesi ve tedavisine dayalı gen terapisi örnekleri (Gao ve ark., 2014; Aouadi ve ark., 2013; Jourdan ve ark., 2013; Yi ve ark., 2013; Kandasamy ve ark., 2012)

Gen Adı	Gen Transfer Metodu	Hedef Organ	Hayvan Modeli	Sonuç	Kaynak
Terapötik Genlerin Transferi					
Adiponektin	Elektroporasyon	Gastrocnemius kası	HFD'li C57BL/6 fareleri	Kilo alımını baskılama	Kandasamy ve ark., 2012
Adiponektin ve adiponektin reseptörü 2	Hidrodinamik	Karaciğer	HFD'li C57BL/6 fareleri	Obezitenin önlenmesi	Ma ve Liu, 2013
Beta-trophin	Hidrodinamik	Karaciğer	C57BL/6 fareleri	Glukoz toleransının yileştirilmesi	Yi ve ark., 2013
Beyinden türetilen nörotrofik faktör	Adeno-associated virus	Beyin	Genetik obez fareler	Kilo kaybı	Cao ve ark., 2009
Exendin-4	Helper-dependent adenovirus	Sistemik uygulama	HFD'li C57BL/6 fareleri	Kilo alımını baskılama	Samson ve ark., 2008
Exendin-4	Adeno-associated virus	Tükürük bezi	HFD'li CD1 fareleri ve Zucker sıçanları	Kilo alımını baskılama	Di Pasquale ve ark., 2012
Fibroblast büyüme faktör 21	Hidrodinamik	Karaciğer	HFD'li C57BL/6 fareleri	Obezitenin önlenmesi ve tedavisinde etkili olma	Gao ve ark., 2014
İnterlökin 10	Hidrodinamik	Karaciğer	HFD'li C57BL/6 fareleri	Obezite, insülin direnci engellenmesi	Gao ve ark., 2013

Tablo 9. Obezitenin önlenmesi ve tedavisine dayalı gen terapisi örnekleri (Gao ve ark., 2014; Aouadi ve ark., 2013; Jourdan ve ark., 2013; Yi ve ark., 2013; Kandasamy ve ark., 2012)

Gen Adı	Gen Transfer Metodu	Hedef Organ	Hayvan Modeli	Sonuç	Kaynak
Terapötik Genlerin Transferi					
Irisin	Adenovirüs	Sistemik uygulama	HFD'li C57BL/6 fareleri	İnsülin direnci ve vücut ağırlığında azalma	Bostrom ve ark., 2012
Leptin	Adenovirüs	Sistemik uygulama	Genetik obez fareler	Obezitenin ve diyabetin düzeltilmesi	Muzzin ve ark., 1996
Leptin	Adeno-associated virus	Beyin	HFD'li normal fareler	Obezitenin önlenmesi ve tedavisinde etkili olma	Wilsey ve ark., 2003
Endojen Genlerin Yıkılması					
Kanabinoid tip 1 reseptörü	β 1,3-D-glukan kapsüllenmiş siRNA parçacıklarının intraperitoneal enjeksiyonu	D68 + peritoneal makrofajlar	Zucker diyabetik yağlı sıçanlar	B hücre yetmezliğini önleme ve normoglisemiye dönüş	Jourdan ve ark., 2013
c-Jun amino terminal kinaz	Adenovirüs	Sistemik uygulama	HFD kaynaklı ve genetik obez fareler	Obezite ile ilişkili hiperinsülinemi yi azaltmak	Wilcox ve ark., 2006
Hipoksiye bağlı faktör	Düşük moleküler ağırlıklı, antisens oligonükleotit konjuge protaminin intraperitoneal enjeksiyonu	Sistemik uygulama	HFD'li obez fareler	Kilo kaybı	Park ve ark., 2012

Tablo 9. Obezitenin önlenmesi ve tedavisine dayalı gen terapisi örnekleri (Gao ve ark., 2014; Aouadi ve ark., 2013; Jourdan ve ark., 2013; Yi ve ark., 2013; Kandasamy ve ark., 2012)

Gen Adı	Gen Transfer Metodu	Hedef Organ	Hayvan Modeli	Sonuç	Kaynak
Endojen Genlerin Yıkılması					
Hipoksiye bağlı faktör	Antisens oligonükleotidlerin intraperitoneal enjeksiyonu	Sistemik uygulama	HFD'li obez fareler	Kilo kaybı	Shin ve ark., 2012
Stearoil-CoA desatürazı 1	Antisens oligodeoksinük leotidlerin intraperitoneal enjeksiyonu	Sistemik uygulama	HFD'li C57BL/6 fareleri ve SD ratları	İnsülin direncinin iyileştirilmesi	Gutierrez-Juarez ve ark., 2006
Tümör nekroz faktörü α ve osteopontin	Glukan kapsülle kaplanan siRNA'ların intraperitoneal enjeksiyonu	Adipoz doku	C57BL6 genetik obez erkek fareler	Glukoz toleransının iyileştirilmesi	Aouadi ve ark., 2013

3. MATERYAL VE METOT

Çalışmamızda, Samsun ve çevresinden OMÜ Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi Pediatrik Endokrinoloji Polikliğine başvuran ve persentil hesaplamaya göre vücut kitle indeksi (VKI > 95th) ile obezite tanısı konulan, puberte öncesi, 6-12 yaş arası, 49 obez (obez n=49) çocuk dahil edildi. Kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet açısından obez gruba uygun aralıkta sağlıklı ve normal kilolu 49 çocuk (kontrol n=49) toplam 98 periferik kan örneği toplandı. Çalışmada kronik hastalık, kronik ilaç kullanımı, endokrin, metabolik ya da genetik nedenli boy kısalığı dışlama kriterleri olarak belirlendi. Tüm gönüllülerden; periferik kan örneği ile yapılacak bu çalışma için, ailesine ve kendisine ait onamları alınarak, hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu, çocuk olur formu, hasta bilgi formunu doldurmaları sağlandı.

OMÜ Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 2016/301 karar nolu araştırma projemiz, 29.09.2016 tarihinde toplanan etik kurulda incelendi ve etik açıdan uygunluğu oy birliği ile kabul edildi.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve temin edilen markaları aşağıda verilmiştir.

- EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) (Sigma, ABD)
- Saf Etanol (Sigma- Aldrich, Almanya)
- Agaroz (Prona, Nu micropor)
- Etidyum Bromid (ETBr) (SERVA, Almanya)
- 6X yükleme boyası (Thermo Fisher Scientific, Litvanya)
- Tris (Hydroxymethyl aminomethane) (MERCK, Almanya)
- Borik asit (Amresco, ABD)
- Kloroform (MERCK, Almanya)
- DNA İzolasyon Kiti (Invitrogen Pure Link[®] Genomic DNA Mini Kit, ABD)
- EpiJET Bisülfid Dönüşüm Kiti (Thermo Fisher Scientific, Litvanya)
- Dream Taq[™] Hot Start DNA Polimeraz enzimi (Thermo Fisher Scientific, Litvanya)
- Cells to CpG[™] Metile ve Unmetile gDNA Kontrol Kit (Applied Biosystems, ABD)

- Gene Ruler 50bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Litvanya)
- 10X Dream Taq Hot Buffer with 20 mM Magnezyum Klorür (Thermo Fisher Scientific, Litvanya)
- Primerler (Oligomer Biyoteknoloji, Türkiye)
- dNTP Mix (Thermo Fisher Scientific, Litvanya)
- miRNA izolasyon kiti: Quick-RNA™ Whole Blood (Zymo Research, ABD)
- cDNA sentez kiti: ipsogen® RT Kit 33,V1 (QIAGEN, Almanya)
- Revers transkripsiyon primerleri: Taqman™ MicroRNA Assays (Applied Biosystems, ABD)
- qRT-PZR Master Mix: Premix Ex Taq™ Perfect Real Time (Takara, Japonya)
- qRT-PZR primer-problar: Taqman™ MicroRNA Assay *hsa-miR-130b* ve Taqman™ MicroRNA Assay *hsa-miR-146b-5p* (Applied biosystems, ABD)
- qRT-PZR referans gen: ipsogen® BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (QIAGEN, Almanya)

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Teknik Malzemeler

Çalışmamızda OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalındaki mevcut cihaz ve teknik malzemeler kullanılmıştır.

- Otoklav (Nüve OT 4060, Türkiye)
- Mikrosantrifüj (Nüve NF048, Türkiye)
- Hassas terazi (Shimadzu, Japonya)
- Dijital Isı Bloğu (VWR Digital Hetblock, ABD)
- Otomatik pipetler (Ependorf, Socorex, Rainin)
- Yatay elektroforez tankı ve güç kaynağı (Junyi JY300C, Çin)
- Nano-drop DNA sayacı (Jenway Genova Nano, İngiltere)
- Thermal Cycler GeneAmp® 9700 PCR System (Applied Biosystems, ABD)
- Mikrodalga (Arçelik MD 674, Türkiye)
- UV görüntü analiz sistemi (Daihan Scientific, Güney Kore)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu (Ariston, İtalya)
- Vorteks (Clifton Cyclone, İngiltere)
- Bidistile su cihazı (Nüve, Türkiye)

- qPZR cihazı: Rotor-gene Q 5 PLEX HRM (Almanya, ABD)

3.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanması

10XTBE (Tris -Borik asit-EDTA) solüsyonu:

108 g Tris, 55 g Borik asit, 20 ml EDTA 0,5 M (pH: 8) karıştırılıp toplam hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı, iyice karıştırıldı. Oda ısısında saklandı.

1XTBE: 100 ml 10XTBE solüsyonu üzerine 900 ml bidistile su eklendi, iyice karıştırıldı. Oda ısısında saklandı.

Ethidium bromid solüsyonu (10 mg/ml):

100 mg ethidium bromid, 10 ml distile su içinde çözündü. Işık almayan bir şişe içinde +4°C'de saklandı. Çalışma solüsyonu, hazırlanan stok solüsyonundan konsantrasyon 0,5 µg/µl olacak şekilde hazırlandı 0°C'de saklandı.

3.4. Kan örneklerinin toplanması

Çalışmamızda, obez ve kontrol grubundaki gönüllülerden 2ml'lik EDTA'lı tüplere periferik kan örnekleri alındı. DNA ve RNA izolasyonları yapılınca kadar OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.4.1 Kandan DNA İzolasyonu

Toplanan örneklerden, DNA izolasyonu, perikferik kan lökositlerinden, DNA izolasyonu, 'Pure Link[®] Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, ABD) protokolü kullanılarak yapıldı. İzolasyonda kullanılacak olan Pipet uçları ve ependorf tüpler otoklavda steril edildi. Dijital ısı bloğu 55°C'ye ayarlandı. -20°C'de bekleyen kan örnekleri oda sıcaklığında çözündürüldü.

Kan örneklerinden DNA izolasyon protokolü aşağıdaki gibi uygulandı:

Kit içerisindeki Pure Link[®] Genomic Wash Buffer 1 ve Pure Link[®] Genomic Wash Buffer 2'ye üzerinde yazan miktarlarda %100'lük etanol eklendi.

Lizis;

- 200 µl kan örneği steril 1,5 ml'lik ependorf tüpe pipetlendi.
- Üzerine kit içerisinde bulunan 20 µl Proteinaz K ve 20 µl RNAz A eklendi. Kısa süre vorteksenerek karıştırıldı, oda sıcaklığında 2dk inkübe edildi.

- 200 µl Purelink Genomik Lysis/ Binding Buffer eklendi ve homojen bir solüsyon elde edene kadar iyice vortekslendi.
- Proteinlerin parçalanması için dijital ısı bloğunda 55°C’de 10 dk inkübe edildi.
- 200µl %100’lük etanol lizata eklendi, 5 sn vortekslenerek homojen bir solüsyon elde edildi.

DNA Bağlanma;

- Hazırlanan 640 µl’lik lizat kolonuna (Pure Link® Spin Column) aktarıldı ve 10.000xg’de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı ve kolon temiz bir toplama (Pure Link® Collection Tube) tüpüne yerleştirildi.

DNA Yıkama;

- 500 µl ‘Pure Link® Genomic Wash Buffer 1’ kolona eklendi.
- Oda sıcaklığında 10.000xg’de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpü atıldı ve kolon temiz bir toplama tüpüne yerleştirildi.
- 500 µl ‘Pure Link® Genomic Wash Buffer 2’ kolona eklendi.
- Oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dk santrifüj yapıp ve toplama tüpü atıldı.

DNA Ayrılma ve Saklama

- Kolon steril 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 50µl ‘Pure Link® Genomic Elution Buffer’ kolona eklendi.
- Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Sonra maksimum hızda 1,5 dakika santrifüj edilerek genomik DNA 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne toplandı. Kolon atıldı.
- DNA örnekleri sonraki işlemler için -20°C’de saklandı.

3.4.2. DNA Miktarının Tayini

DNA miktar tayini UV spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirildi. Cihaz açıldıktan sonra 2 µl distile suyla körlleme yapıldı. Daha sonra 2 µl DNA örneği ile 260 ve 280 nm dalga boylarında (OD260/280) ölçüm yapıldı.

3.4.3 Bisülfite Modifikasyon Yöntemi

DNA Metilasyon analizi için, gönüllü bireylere ait kan örneklerinden saflaştırılan DNA örneklerine, her bir örnek için 500 ng/20 µl DNA kullanılarak bisülfite modifikasyonu yapıldı. “EpiJET Bisulfite Conversion Kit” protokolüne göre bisülfite

modifikasyonları yapılmıştır. Bisülfıt modifikasyon yöntemi, DNA'nın bisülfıtla muamele edilmesi ve metillenmemiş sitozinlerin deaminasyon ile urasile dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Metillenmiş sitozinlerde böyle bir dönüşüm meydana gelmemektedir. 'Cells to CpG™ Metile ve Unmetile gDNA Kontrol Kit', metile ve unmetile DNA kontrollerine de bisülfıt modifikasyonu yapıldı.

Genomik DNA örneklerine Bisülfıt modifikasyon işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

Modifikasyon Reaktifinin Hazırlanması: Verilen her flakondaki modifikasyon reaktif miktarı, 10 DNA dönüşüm reaksiyonu için yeterlidir.

1. Bir şişe kuru modifikasyon reaktifine:

- 0,9 ml distile su
- 200 µL modifikasyon solüsyon 1
- 60 µL modifikasyon solüsyon 2 eklendi.

2. Modifikasyon reaktifini yaklaşık 10 dk boyunca ters düz çevirerek çözdürüldü.

Wash Buffer Hazırlanışı: Kullanmadan önce 9 ml Wash Buffer'a 25ml %100'lük etanol eklendi.

Desulfonation Buffer Hazırlanışı: Kullanmadan önce 3,5 ml Desulfonation Buffer'a 10 ml %100'lük etanol eklendi.

Bisülfıt Modifikasyonu

1. 500 ng saf genomik DNA içeren 20 µL DNA örneği bir PZR tüpüne koyuldu.

2. 500 ng/20 µL DNA örneğini içeren PZR tüpüne 120 µL 'Modification Reagent' solüsyonu eklendi. Pipetaj yaparak karıştırıldı.

3. PZR tüpü dijital ısı bloğuna yerleştirildi. 98°C'de 10 dakika ve hemen ardından 60°C'de 150 dakika bekletildi.

4. Toplama tüpüne yerleştirilmiş 'DNA Purification Micro Column' kolonuna 400 µL 'Binding Buffer' eklendi.

5. 3. Adımdaki dönüştürülen DNA örneğini kolondaki 'Binding Buffer'a eklendi, pipetaj yapılarak tamamen karıştırıldı.

6. Toplama tüpüne yerleştirilen kolon 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı. Aynı koleksiyon tüpüne kolon yerleştirildi.

7. 200 µL ‘Wash Buffer’ mikro kolona eklendi ve 12.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı. Aynı toplama tüpüne kolon yerleştirildi.

8. 200 µL ‘Desulfonation Buffer’ kolona eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

9. Toplama tüpüne yerleştirilen kolon 12.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı. Aynı toplama tüpüne kolon yerleştirildi.

10. 200 µL ‘Wash Buffer’ kolona eklendi ve 12.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı. Aynı toplama tüpüne kolon yerleştirildi.

11. 200 µL ‘Wash Buffer’ kolona eklendi ve 12.000 rpm’de 60 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü ve içindeki sıvı atıldı.

12. Kolon 1,5 ml’lik temiz mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolona 10 µL ‘Elution Buffer’ eklendi. 12.000 rpm’de 60 saniye santrifüj edildi.

13. Elde edilen bisülfıt modifikasyonu yapılmış DNA örneği, MSP’de kullanıldı. Daha sonra kullanılacak örnekler -20°C’ye kaldırıldı.

3.4.4. Metilasyon Spesifik PZR (MS-PZR)

Bisülfıt Modifikasyonu yapılmış DNA örneklerinin, MSP yöntemi ile CpG adacıklarındaki metilasyon durumu belirlendi. MSP yönteminde DNA Amplifikasyon kiti olan ‘DreamTaq™ Hot Start DNA Polymeraz enzimi’ ve metilasyona spesifik oligonükleotit primerler kullanıldı. Bisülfıt modifikasyonu yapılmış olan DNA örneklerindeki *IL-6* ve *HIF-3A* geninin promotor metilasyon profili belirlendi.

MS-PZR yönteminde kullanılan ve ilgili genlerin metilasyon profiline özgün (MSP) olan ve olmayan (USP) primerler ‘<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>’ adresindeki program kullanılarak tasarlandı (şekil 5, şekil 6). MSP oligonükleotit dizileri, primerlerin hibridizasyon sıcaklığı, beklenen ampikon büyüklükleri Tablo 10’de gösterilmektedir.

CpG island prediction results
Criteria used: Island size > 100, GC Percent > 50.0, Obs/Exp > 0.60
No CpG islands were found in your sequence
Primer picking results for methylation specific PCR (MSP)

61 TCATTGCTGGCACAGAGGCCTGGTTTCATTCATAAATCCTTCATAGGCCAACACACCAGGTG
| : | | | : | | : | : | | | | : | | | | : | | : | | | | : : | | | | : | | | : | : |
61 TTATTGTTGGTATAGAGGTTTGTTTTATTTATAATTTTTTATAGGTAAGATATTAGGTG

M>>>>>>>>>>>>>>>>>>
U>>>>>>>>>>>>>>>>>>

```

181 CAAAGAGCTAGCATGTATTGTGGGATTACTATGC GCCAGGAATTTTTTACACTGCATCAC
   :|||:|||:|||:|||:|||:|||:|||:|||:|||:|||:|||:|||:|||:|||:|||+
181 TAAAGAGTTAGTATGTATTGTGGGATTATTATGC GTTAGGAATTTTTTATATTGTATTAC
                                     M<<<
                                     U<<<

```

```

*****
*   Explanations   *
*-----*
* Upper row: Original sequence *
* Lower row: Bisulfite modified sequence *
* (For display, assume all CpG sites are methylated) *
* CpG sites *
* ++ *
* ::: Non-CpG 'C' converted to 'T' *
* M >>>>> Left methylated-specific primer *
* M <<<<< Right methylated-specific primer *
* *
* U >>>>> Left unmethylated-specific primer *
* U <<<<< Right unmethylated-specific primer *
*****
http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer_results.cgi

```

47

Tablo 10. MS-PZR primer dizileri, hibridizasyon sıcaklıkları ve beklenen ampikon büyüklükleri (MSP: metilasyona spesifik primer, USP: metilasyona spesifik olmayan primer, F: forward, R: reverse, bp: baz çifti)

Primer Adı	Baz Dizisi 5'-3'	Baz Sayısı	T _m (°C)	Ampikon büyüklüğü (bp)
<i>IL-6</i> MSP-F	ATAGGTAAGATATTAGGTGAATCGA	25	56	166
<i>IL-6</i> MSP-R	TTTCTAAAACTATTATAAAAATAAAACGTA	30	53	166
<i>IL-6</i> USP-F	ATAGGTAAGATATTAGGTGAATTGA	25	55	166
<i>IL-6</i> USP-R	TTTCTAAAACTATTATAAAAATAAAACATA	30	52	166
<i>HIF-3A</i> MSP-F	TAGGTTTGGCGTGGTATAGTTAATC	25	60	259
<i>HIF-3A</i> MSP-R	CCCGAAACGTTCTTAACTCG	20	57	259
<i>HIF-3A</i> USP-F	TTTAGGTTTGGTGTGGTATAGTTAATTG	28	59	262
<i>HIF-3A</i> USP-R	CCCCAAAACATTCTTAACTCAC	22	57	262

‘Cells to CpGTM Methylated and Unmethlated gDNA Controls’ pozitif metile ve pozitif unmetile kontrol olarak kullanıldı. Metile ve unmetile spesifik reaksiyon karışımları iki farklı steril ependorf tüpte hazırlandı. PZR tüplerine konuldu. PZR için Thermal Cycler’a örnekler konuldu ısı döngüsü optimize edildi. Metilasyona spesifik PZR protokolü Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. Metilasyona spesifik metile/unmetile PZR (MS-PZR) protokolü

Stok Madde Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon	Kullanılan Miktar
10X PCR Buffer (MgCl ₂ içeren)	1X PCR Buffer (MgCl ₂ içeren)	2,5 µl
dNTP (25 mM)	dNTP (200 µM)	0,2 µl
Forward Primer 100 pmol/µl	Forward Primer 20 pmol/µl	0,2 µl
Reverse Primer 100 pmol/µl	Reverse Primer 20 pmol/µl	0,2 µl
Kalıp DNA (Bisülfite modifiye edilmiş) 500 ng/10µl	Kalıp DNA 100 ng/2 µl	3 µl
DreamTaq TM Hot Start DNA Polymerase Enzimi (5 U/µl)	DNA Polimeraz enzimi (1,25 U)	0,25µl

HIF-3A geni için MSP koşulları (metile ve unmetile) Tablo 12’de, *IL-6* geni için MSP koşulları Tablo13’de verilmiştir.

Tablo 12. *HIF-3A* geni için MSP-PZR koşulları (metile ve unmetile)

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	98	10 dk	1
Denatürasyon	97	45 sn	40
Primer Bağlanması	60	45 sn	40
Zincir Uzaması	72	70 sn	40
Son Uzama	72	7 dk	1

Tablo 13. *IL-6* geni için MS-PZR koşulları (metile ve unmetile)

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	97	5 dk	1
Denatürasyon	96	45 sn	40
Primer Bağlanması	56	45 sn	40
Zincir Uzaması	72	60 sn	40
Son Uzama	72	7 dk	1

3.4.5 Agaroza Jel Elektroförez

Agaroz Jel Hazırlanışı: MS-PZR ürününü görüntölemek için %2’lik mikropor agaroz jel hazırlanır, bunun için 2 gr nu-mikropor agaroz hassas terazide tartıldı. Agaroz üzerine 100 ml 1XTBE eklenip mikrodalgada iyice çözünene kadar kaynatıldı. Sonradan soğumaya bırakılan jelin sıcaklığı 80°C’ye ulaşınca üzerine (çekerek ocak açık haldeyken) 100 µl EtBr (0,5 µg/µl’lik çalışma solüsyondan) eklendi. Jel hafifçe çalkalanıp EtBr ile karışması sağlandı ve tarağı yerleştirilmiş olan jel kabına döküldü. Yaklaşık 1 saat kadar beklenip jel katılaştıktan sonra taraklar çıkarıldı. Jel 1XTBE içeren yatay elektroforez tankına yerleştirildi jeldeki kuyucuklara PZR ürünleri yüklendi.

MS-PZR ürünleri, 1:6 oranında 6X yükleme boyası ilave edilerek jele yüklendi. Marker olarak 50 bp DNA Ladder kullanıldı. 125 voltluk elektrik akımında 20-25 dakika yürütüldü. Jel UV transillüminatörü ile görüntülendi.

HIF-3A geni promotorunun metile olan ve olmayan ürünlerinin boyutu sırasıyla 259 ve 262 bp olarak belirlendi. *IL-6* geni promotorunun metile olan ve

olmayan ürünlerinin boyutu ise 166 bp olarak belirlendi. Genin metilasyon durumu, ampikon ürünlerinin hem M hem de U primerle yapılan PZR'da gözlenmesi durumunda metillenmiş (metile) olarak kabul edildi. Yalnızca U primerlerle yapılan reaksiyonda amplifikasyon görülmesi durumunda ise metillenmemiş (unmetile) olarak kabul edildi.

3.4.6. Kandan Mikro RNA İzolasyonu

Obez ve kontrol grubunu oluşturan gönüllülere ait kan örneklerinden 'Quick-RNA™ Whole Blood' kiti kullanılarak miRNA izolasyonu yapıldı.

İzolasyon Öncesi Reaktif Hazırlığı:

- 24 ml RNA Wash Buffer konsantresine 96 ml % 100 etanol eklendi.
- Liyofilize DNaz I'i 1 U/μl' de sulandırmak için şişe başına 275 μl DNaz / RNaz İçermeyen su eklendi. Hafifçe ters çevirerek karıştırıldı. -20°C' de dondurularak saklandı.
- Liyofilize Proteinaz K' yı 20 mg/ml'de sulandırmak için şişe başına 1040 μl Proteinaz K Storage Buffer eklendi. Çözünmesi için vortekslendi. -20°C' de dondurularak saklandı.

MiRNA izolasyon Protokolü:

1. 200 μl tam kana 200 μl DNA/RNA Shield eklendi.
2. 8 μl Proteinaz K eklendi ve karıştırıldı. 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
3. Eşit miktarda izopropanol eklendi ve vortekslendi.
4. Örnek toplama tüpü içindeki ZymoSpin IIIGC kolona transfer edildi ve 14.000 g' de 30 saniye santrifüj edildi. Kolon RNaz içermeyen tüp içine transfer edildi.
5. 200 μl RNA Recovery Buffer ZymoSpin IIIGC kolona eklendi ve 14.000 g' de 30 saniye santrifüj edildi.
6. RNaz içermeyen tüp içine akan kısma 200 μl etanol (%95-100) eklendi ve iyice karıştırıldı.
7. Karışım toplama tüpü içindeki ZymoSpin IC kolona transfer edildi ve 14.000 g' de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü döküldü.

DNAZ I muamelesi (kolonda):

(D1) 400 μl RNA Wash Buffer ile kolon yıkandı ve 14.000 g' de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü döküldü.

(D2) RNaz içermeyen bir tüpe, 5 µl DNaz I, 35 µl DNA Digestion Buffer eklendi ve ters düz edilerek karıştırıldı. Direk kolona eklendi.

(D3) Kolon oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. 8. adıma geçildi.

8. 400 µl RNA Prep Buffer kolona eklendi ve 14.000 g' de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü döküldü.

9. 700 µl RNA Wash Buffer kolona eklendi ve 14.000 g' de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü döküldü.

10. 400 µl RNA Wash Buffer eklendi ve yıkama tamponunun tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için kolon 2 dakika 14.000 g'de santrifüj edildi. Kolon dikkatlice RNaz içermeyen bir tüpe aktarıldı.

11. 15 µl DNaz/RNaz içermeyen su direk kolona eklendi ve 14.000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Kolon atıldı ve RNaz içermeyen bir tüpdeki RNA örneğinin miktarı ve saflığı Nano-drop cihazı ile ölçülüp -80°C' de saklandı.

3.4.7. Revers Transkripsiyon ile cDNA Sentezi

Total RNA'dan elde edilen miRNA'lardan ters transkripsiyon ile cDNA sentezi 'İpsogen® RT Kit 33,V1' kiti kullanılarak yapıldı.

MiRNA'dan cDNA elde etmek için yapılan ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyon karışımının (toplam 15 µl) içerikleri Tablo 14'de gösterilmiştir.

Tablo 14. cDNA sentezinde kullanılan ters transkripsiyon (RT) PZR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Örnek başına hacim (µl)
10 mM dNTP Mix	2 µl
İpsogen® Reverse Transkriptaz (200 U/ µl)	1 µl
5X Reverse Transkripsiyon Buffer	5 µl
5X RT Primer (TaqMan® MicroRNA Assay)	5.25 µl
RNaz İnhibitör (40 U/ µl)	0.5 µl
DTT (Dithiothreitol)	1.25 µl

Revers Transkripsiyon Öncesi Hazırlık:

- Ters transkripsiyon kitinin bileşenleri buz üzerinde çözöldü.
- İçeriğı dibe toplamak için tüpler (vortekslenmeden) 10,000x g'de 10 saniye santrifüj edildi.

MiRNA örneklerinden cDNA sentez protokolü aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

1. Test edilecek her bir RNA numunesinden 5µl, 65°C'de 5 dakika inkübe edildi.
2. Hemen 5 dakika buz üzerinde soğutuldu.
3. İçeriğı dibe toplamak için tüpler 10,000x g'de 10 saniye santrifüj edildi. Buz üzerinde tutuldu.
4. Ters transkripsiyon reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı ve buz üzerinde tutuldu.
5. Vortekslenmeden hafifçe karıştırılıp kısa süre santrifüj edildi, her bir RNA örneğı ve su kontrolüne (NTC) 15 µl ters transkripsiyon reaksiyon karışımı eklendi.
6. Üzerine 5,25 µl 5X RT primer eklendi, hafifçe karıştırılıp kısa süre santrifüj edilerek karışım tüpün dibinde toplandı.
7. Tüpler ısı döngü cihazı içine konuldu ve Tablo 15'deki PZR programı ile reaksiyon gerçekleştirildi.
8. Reaksiyon sonrasında cDNA örnekleri, Eş Zamanlı PZR (qRT-PZR) analizi gerçekleştirilene kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 15. Ters transkripsiyon PZR programı

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç	16	30 dakika
Reverse transkripsiyon	42	30 dakika
RT inaktivasyon	85	5 dakika
İsteğe bağı aşama	4	∞

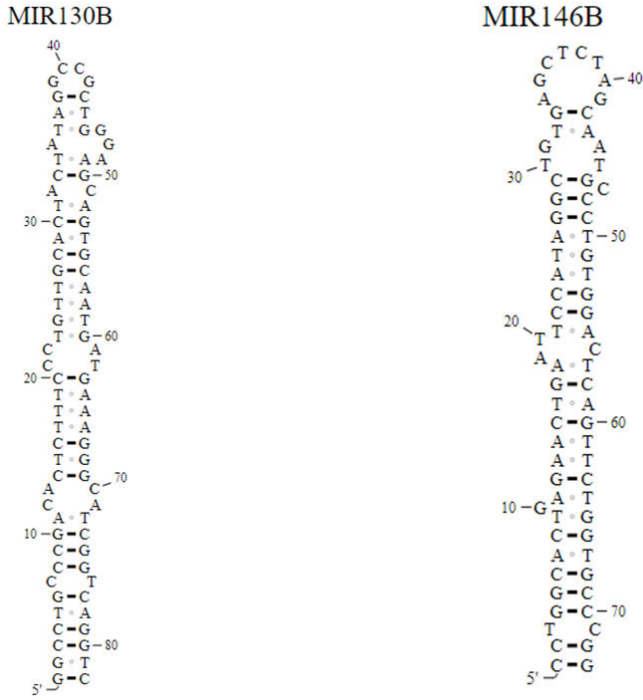
3.4.8. Eş-Zamanlı PZR (qRT-PCR) yöntemi

Eş-zamanlı kantitatif Real-time PZR nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metottur. “Real-time PZR”da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir (Günel T, 2007).

“TagMan® probe” yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA’ya komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA). 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmalarını engellemektedir. Prob hedef DNA’ya bağlanma durumunda bile floresan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında “Taq Man” problemler bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM’ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı arttıkça floresanda ona bağlı olarak artmaya devam eder (Günel T, 2007).

Primerlerin Seçimi

Hsa-miR-130b, 22. kromozomun 22q11.21 bölgesinde lokalizedir ve 1 ekzona sahiptir. *Hsa-miR-130b-5p* mikroRNA dizisi ‘ACUCUUUCCCUGUUGCACUAC’ şeklindedir (Mirbase, 2018). Sekonder yapısı şekil 7’de gösterilmektedir.



Şekil 7. *mir-130b* ve *miR-146b* seconder yapısı (Ensembl, 2019).

HmiR-146b, 10. kromozomun 10q24.32, bölgesinde lokalizedir ve bir ekzona sahiptir. *Hsa-miR-146b-5p* mikroRNA dizisi ‘UGAGAACUGAAUCCAUAGGCUG’ şeklindedir (Mirbase, 2018).

3.4.9. *Hsa-miR-146b-5p* ve *hsa-miR-130b-5p* İfade Düzeylerinin Ölçümü

Hsa-miR-146b-5p ve *hsa-miR-130b-5p*’nin qRT-PZR’ı için ‘Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)’ master mix ile ‘Taqman™ MicroRNA Assay *hsa-miR-130b* ve Taqman™ MicroRNA Assay *hsa-miR-146b-5p*’ kullanıldı. Her bir örnekteki RNA, ABL housekeeping referans geni (İpsogen® BCR-ABL1 Mbc IS-MMR) kullanılarak normalize edildi.

qRT-PZR analizi aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

1. Taqman™ MicroRNA Assay (20X) ve cDNA örnekleri buz üzerinde çözdürüldü.
2. Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) master mix kullanmadan önce şişesi hafifçe çalkalanarak karıştırıldı.
3. Her bir assay için yapılacak reaksiyon sayıları hesaplandı. Her reaksiyon iki tekrarlı olarak hesaplandı ve yapıldı.

4. Her plate, cDNA örneklerinin her biri için bir miRNA assay, bir standart assay ve kalıp içermeyen kontrol (no template control: NTC) içerecek şekilde hazırlandı.

5. qRT-PZR reaksiyonu toplam 20 µl hacimle gerçekleştirildi.

6. qRT-PZR reaksiyon karışımı, her bir assay için ayrı ve steril 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde, Tablo 16'daki bileşenler ve miktarlarla hazırlandı. Tüpler hafifçe karıştırıldı ve kısaca santrifüj yapıldı.

Tablo 16. qRT-PZR reaksiyon karışımı

Bileşenler	Örnek başına hacim (µl)
TaqMan® MicroRNA Assay (20X)	1 µl
cDNA	5 µl
Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) master mix	12.5 µl
Nükleaz içermeyen su	6.5 µl

7. qRT-PZR reaksiyon karışımı ve cDNA örnekleri, her bir örnek için üç tekrar olacak şekilde 72-kuyucuklu plate içine aktarılarak eş zamanlı PZR cihazına yüklendi.

8. Isı döngü cihazı ayarları Tablo 17'de verilen qRT-PZR programına göre ayarlandı ve reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 17. qRT-PZR programı

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	10 saniye
Denatürasyon	95°C	5 saniye
Bağlanma/Uzama	60°C	30 saniye

Eşik döngüsü (Ct) floresan seviyenin belirli bir miktara ulaştığı ve eşiği geçtiği miktarı temsil eder. Bu yöntem ile doğrudan hedefin ve normalizasyon için kullanılan

referans genin Ct değerlerinden hesaplama gerçekleştirilebilir. MiRNA ekspresyonundaki rölatif değişimler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandı.

3.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel güç analizi yapılarak örnek büyüklüğü belirlenmiştir. Obez ve kontrol DNA metilasyonlarını değerlendirmek için %95 güven aralığında d=0,122'lik farkı (maksimum 0,11 sapma ile) saptamak üzere %97 güç (power) için hasta ve kontrol grubu katılımcı sayısı 49 hasta ve 49 kontrol şeklinde hesaplanmıştır. MiRNA ekspresyon analizi için 15 obez ve 15 sağlıklı kontrol çocuk çalışılmıştır (Mansego ve ark., 2017, Lacomino ve ark, 2016).

Çalışmanın sonuçları istatistiksel yöntemlerle değerlendirilerek hipoteze uygunluk bakımından test edildi. Parametreler arasındaki ilişki OpenEpi 3.01 sürümü (son güncelleme tarihi; 06.04.2013) kullanılarak, Fisher's exact testiyle değerlendirildi. Diğer istatistiksel analizler için SPSS 22.0 versiyonu kullanıldı. MiRNA ekspresyonunun istatistiksel önemi t-testi ile değerlendirildi. Sonuçların $p < 0.05$ olması durumunda; değerlendirilen parametreler için farkın, istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Obez ve Kontrol Grubu Demografik ve Klinik Özellikleri

Çalışmamıza Mart 2018-Temmuz 2018 tarihleri arasında Samsun ve çevresinden OMÜ Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi Pediatrik Endokrinoloji Polikliğine başvuran ve obezite tanısı konan 49 obez (n=49) çocuk ve 49 sağlıklı kontrol çocuktan (n=49) oluşan, toplam 98 çocuk dahil edildi. Obez ve kontrol grubunun demografik özellikleri Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18. Obez ve kontrol grubu demografik özellikleri

Demografik Özellikler		Obez Grubu	Kontrol Grubu
Cinsiyet	Kız/ Erkek	22 / 27	29 / 20
	(%)	(%44.9 / %55.1)	(%59.1 / % 40.9)
Yaş (Yıl)	Ortalama $\pm$ SS	10.05 $\pm$ 1.91	9.2 $\pm$ 2.03
	Ortanca (Min-Max)	10.5 (6-12)	9 (6-12)
Boy (cm)	Ortalama $\pm$ SS	143.4 $\pm$ 13.3	127.91 $\pm$ 13.65
	Ortanca (Min-Max)	143 (115-166.5)	127 (102-160)
Kilo (kg)	Ortalama $\pm$ SS	59.04 $\pm$ 16.25	26,84 $\pm$ 7.12
	Ortanca (Min-Max)	62.5 (30-92)	26.4 (16- 43.7)
Bel çevresi (cm)	Ortalama $\pm$ SS	85.42 $\pm$ 10.24	59.18 $\pm$ 2.56
	Ortanca (Min-Max)	89 (60-102)	60 (48-67)
Karın çevresi (cm)	Ortalama $\pm$ SS	87.67 $\pm$ 9.66	60.4 $\pm$ 2.49
	Ortanca (Min-Max)	90 (61-104)	61 (50-69)
VKİ (kg /m ²)	Ortalama $\pm$ SS	97 $\pm$ 0.0	25.26 $\pm$ 19.89
	Ortanca (Min-Max)	97 (97-97)	25 (3-75)

Obez çocukların 22’si (%44.9) kız ve 27’si (%55.1) erkeklerden oluşmaktadır. Obez çocukların yaş ortalamaları 10.05 $\pm$ 1.91, ortanca değeri 10.5 olup yaş aralıkları 6-12’dir. Kontrol grubunu oluşturan çocukların 29’u kız (%59.1) ve 20’si (%40.9) erkeklerden oluşmaktadır. Kontrol grubunu oluşturan çocukların yaş ortalamaları 9.2 $\pm$

2.03, ortanca değeri 9 olup yaş aralıkları 6-12'dir. Obez grubunda VKİ ortalaması 97 olarak saptandı. Kontrol grubunda VKİ ortalaması 25 olarak saptandı.

Çalışmaya dahil edilen obez ve kontrol grubu çocuklara ait klinik özellikler olan HDL, LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein), trigliserit, total kolesterol, insülin, glukoz, Homa-IR (insülin direnci homeostatik değerlendirme modeli; açlık plazma glukozu mmol/L x plazma insülin uIU/mL / 22.5, insülin direnci için eşik değer; Homa-IR >2.5 olarak kabul edildi, Koçak ve ark., 2014), AST (Aspartat aminotransferaz) ve ALT (Alanin aminotransferaz) değerleri ortalama, ortanca, minimum ve maksimum değerleri Tablo 19'da verilmiştir.

Tablo 19. Obez ve kontrol grubu klinik özellikleri

Klinik Özellikler		Obez Grubu	Kontrol Grubu
HDL Kolesterol (mg/dL)	Ortalama $\pm$ SS	58.06 $\pm$ 20.55	45.82 $\pm$ 4.75
	Ortanca (Min-Max)	53 (26.5- 130.5)	47 (36- 60.6)
LDL Kolesterol (mg/dL)	Ortalama $\pm$ SS	95.31 $\pm$ 27.4	85.51 $\pm$ 14.41
	Ortanca (Min-Max)	92 (43.5- 180)	85 (62- 143.4)
Trigliserit (mg/dL)	Ortalama $\pm$ SS	129.46 $\pm$ 59.62	80.74 $\pm$ 10.92
	Ortanca (Min-Max)	112.5 (47- 323)	80.3 (45- 100)
Total Kolesterol (mg/dL)	Ortalama $\pm$ SS	163.36 $\pm$ 30.46	99.25 $\pm$ 16.36
	Ortanca (Min-Max)	168.65 (91.4- 219.7)	97 (80- 185)
İnsülin (uIU/mL)	Ortalama $\pm$ SS	13.12 $\pm$ 6.09	4.5 $\pm$ 0.97
	Ortanca (Min-Max)	12.4 (4.2- 33.7)	4.2 (3- 7.1)
Glukoz (mg/dL)	Ortalama $\pm$ SS	88 $\pm$ 11.38	84,9 $\pm$ 8,07
	Ortanca (Min-Max)	85 (72- 134)	83 (61- 100)
Homa-IR	Ortalama $\pm$ SS	2.76 $\pm$ 1.14	0.95 $\pm$ 0.25
	Ortanca (Min-Max)	2.6 (0.9- 5.3)	0.9 (0.6- 1.8)
AST (U/L)	Ortalama $\pm$ SS	30.13 $\pm$ 37.26	24.53 $\pm$ 6.07
	Ortanca (Min-Max)	23.2 (14.4- 282.9)	24 (10.4- 42.8)
ALT (U/L)	Ortalama $\pm$ SS	29.76 $\pm$ 58.65	13.4 $\pm$ 3.98
	Ortanca (Min-Max)	17.1 (6.5- 414.2)	13 (7.5- 30.5)

HDL, LDL, trigliserit, total kolesterol, insulin, glukoz, Homa-IR AST ve ALT değerleri gruplandırılarak Tablo 20’de obez grubundaki parametrik dağılımları kaydedildi. Testlerin çalışılmış olduğu OMÜ tıp fakóltesi hastanesi biyokimya laboratuvarı referans aralıkları esas alındı. Kontrol grubunda referans aralığı dışında test sonucu gözlenmedi.

Tablo 20. Obez grubunun klinik bulgularının parametrik dağılımı

Klinik Bulgular	Parametre	n (%)
LDL	< 160	48 (97.9)
(mg/dL, Referans Aralığı 0-160)	≥ 160	1 (2.1)
HDL	< 75	42 (85.8)
(mg/dL, Referans Aralığı 35-75)	≥ 75	7 (14.2)
Trigliserit	< 200	44 (89.8)
(mg/dL, Referans Aralığı 0-200)	≥ 200	5 (10.2)
T.Kolesterol	< 200	43 (87.8)
(mg/dL, ReferansAralığı 0-200)	≥ 200	6 (12.2)
İnsulin	< 112	48 (97.9)
(uIU/mL, ReferansAralığı 20-112)	≥ 112	1 (2.1)
Glukoz	< 110	34 (69.4)
(mg/dL, Referans Aralığı 70-110)	≥ 110	15 (30.6)
Homa-IR	< 2.5	26 (53.1)
(≥ 2.5)	≥ 2.5	23 (46.9)
AST	< 46	44 (89.8)
(U/L, Referans Aralığı 8-46)	≥ 46	5 (10.2)
ALT	< 40	45 (91.9)
(U/L, Referans Aralığı 0-40)	≥ 40	4 (8.1)

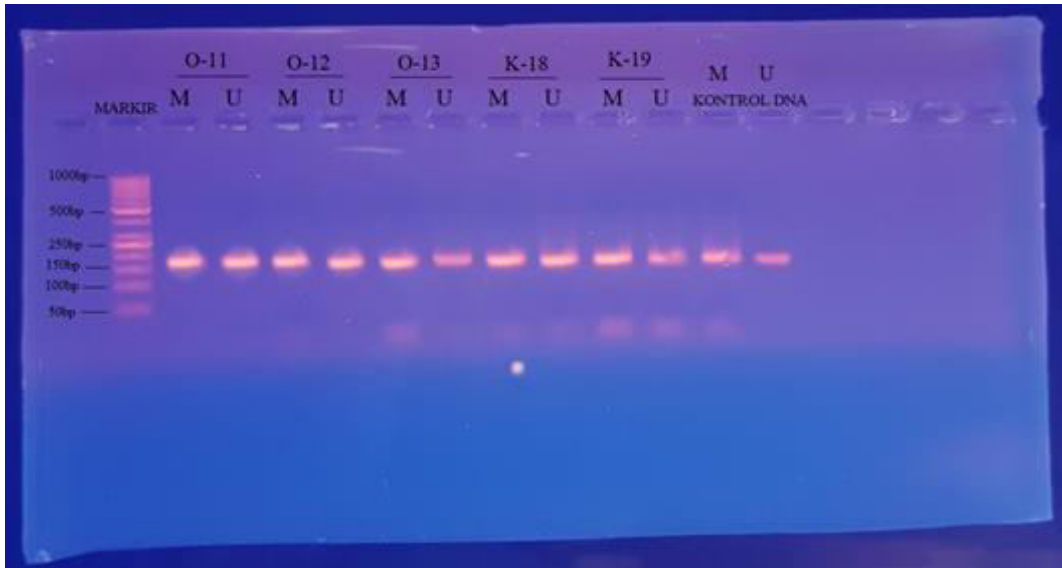
4.2. *HIF-3A* ve *IL-6* Genleri Promotor Metilasyon Analizi Sonuçları

Metilasyona duyarlı PZR sonucunda metile ve unmetile primerler kullanılarak yapılan çalışma sonucunda *HIF3A* genine ait ampikon büyüklüğü metile durumunda 259 b unmetile durumunda ise 262 b olarak saptandı. Çalışma grubuna ait bazı örneklerin *HIF3A* genine ait metilasyona duyarlı PZR sonuçları ile metile ve unmetile bantları gösteren agaroz jel görüntüsü şekil 8’ de görölmektedir.



Şekil 8. *HIF-3A* genine ait MS-PZR sonuçları ve metile (M), unmetile (U) bantları gösteren jel görüntüsü (O: obez, K: kontrol, markır 50 bç).

MS-PZR sonucunda metile ve unmetile primerler kullanılarak yapılan çalışma sonucunda *IL-6* genine ait amplicon büyüklüğü metile durumunda 166 bç unmetile durumunda yine 166 bç olarak saptandı. Çalışma grubuna ait bazı örneklerin *IL-6* genine ait MS-PZR sonuçları ve metile, unmetile bantları gösteren agaroz jel görüntüsü Şekil 9’da görülmektedir.



Şekil 9. *IL-6* genine ait MS-PZR sonuçları ve metile (M), unmetile (U) bantları gösteren jel görüntüsü (O: obez, K: kontrol, markır 50 bç).

HIF-3A promotor bölgesi 49 obez çocukta çalışıldı ve *HIF-3A* geni metilasyonu saptanmadı. Kontrol grubu 49 çocukta da *HIF-3A* geni promotor bölge metilasyonu saptanmadı (Tablo 21, şekil 10).

IL-6 promotor bölgesi 49 obez çocukta çalışıldı ve obez grubunun %93,9'unda (46/49) *IL-6* geni metile olarak saptandı. Kontrol grubunda sağlıklı 49 çocukta da %100 (49/49) oranında *IL-6* geni metile olarak saptandı (Tablo 21, şekil 11).

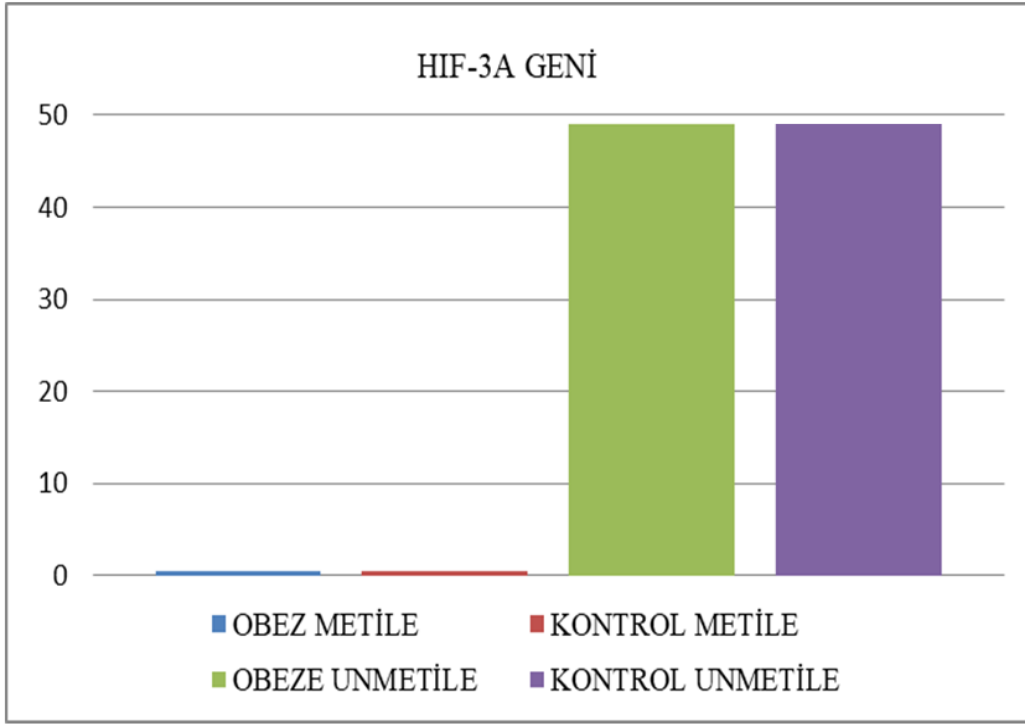
İstatistiksel analiz sonucunda, *HIF-3A* ve *IL-6* genleri promotor metilasyon profili açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$, Tablo 21).

Tablo 21. *HIF-3A* ve *IL-6* genleri promotor metilasyon profillerinin hasta ve kontrol grubunda dağılımı

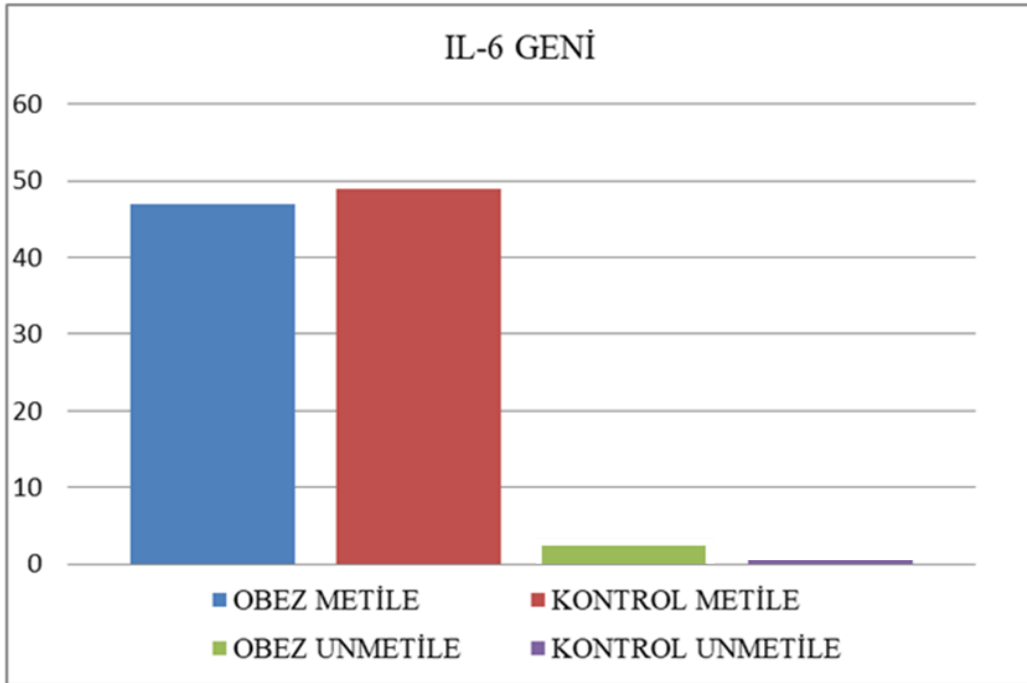
Gen	Grup	Sayı (n)	Metile (%)	Unmetile (%)	P değeri
<i>HIF3A</i>	Obez	49	0	49 (100)	>0.05*
<i>HIF3A</i>	Kontrol	49	0	49(100)	
<i>IL-6</i>	Obez	49	46 (93.9)	3 (6.1)	>0.05*
<i>IL-6</i>	Kontrol	49	49 (100)	0	

$p< 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı değerdir.

* Fisher exact



Şekil 10. *HIF-3A* geni obez ve kontrol grubu metilasyon oranının bar grafiği ile gösterimi



Şekil 11. *IL-6* geni obez ve kontrol grubu metilasyon oranının bar grafiği ile gösterimi

IL-6 geni promotor metilasyon analiz sonuçları obez grubunun klinik bulguları ile karşılaştırıldığında, LDL, HDL, trigliserit, total kolesterol, insulin, Homa-IR, AST, ALT değerleriyle istatistiksel olarak bir ilişki göstermezken, yüksek glukoz değeri ile *IL-6* geni promotor metilasyon durumu istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p=0.024$, Tablo 22).

Tablo 22. *IL-6* geni Promotor Metilasyonu ile klinik bulgular arasındaki ilişki

Klinik Bulgular	Parametre	<i>IL-6</i> Metile (%)	<i>IL-6</i> Unmetile (%)	<i>P</i> değeri
LDL	< 160	12 (24.5)	0 (0)	0.422
	≥ 160	34 (69.4)	3 (6.1)	
HDL	< 75	20 (40.8)	1 (2.0)	0.609
	≥ 75	26 (53.1)	2(4.1)	
Trigliserit	< 200	8 (16.3)	2 (4.1)	0.102
	≥ 200	38 (77.6)	1 (2.0)	
T.Kolesterol	< 200	16 (32.7)	0 (0)	0.296
	≥ 200	30 (61.2)	3 (6.1)	
İnsulin	< 112	18 (36.7)	1(2.0)	0.669
	≥ 112	28 (57.1)	2 (4.1)	
Glukoz	< 110	3 (6.1)	2 (4.1)	0.024
	≥ 110	43 (87.8)	1 (2.0)	
Homa-IR	< 2.5	15 (30.6)	1 (2.0)	0.704
	≥ 2.5	31 (63.3)	2 (4.1)	
AST	< 46	12 (24.5)	0 (0)	0.422
	≥ 46	34 (69.4)	3 (6.1)	
ALT	< 40	28 (57.1)	2 (4.1)	0.669
	≥ 40	18 (36.7)	1 (2.0)	

$p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı değerler koyu karakter ile yazılmıştır.

4.3. Hsa-miR-146b-5p ve hsa-miR-130b QRT-PCR Analiz Sonuçları

Toplam 15 obez ve sağlıklı kontrole ait periferik kan örneklerinden izole edilen *hsa-miR-146b-5p* ve *hsa-miR-130b* miRNA'ların ifade düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile analiz edildi. Her bir örnekteki RNA, ABL housekeeping referans geni (İpsogen® BCR-ABL1 MbcR IS-MMR) kullanılarak normalize edildi.

Eşik döngüsü (Ct) floresan seviyenin belirli bir miktara ulaştığı ve eşiği geçtiği miktarı temsil eder. Bu yöntem ile doğrudan hedefin ve normalizasyon için kullanılan referans genin Ct değerlerinden hesaplama gerçekleştirilebilir.

$$\Delta Ct (\text{obez}) = Ct (\text{obez}) - Ct (\text{referans gen})$$

$$\Delta Ct (\text{kontrol}) = Ct (\text{kontrol}) - Ct (\text{referans gen})$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (\text{obez}) - \Delta Ct (\text{kontrol})$$

MiRNA ekspresyonundaki rölatif değişimler $2^{-\Delta \Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandı

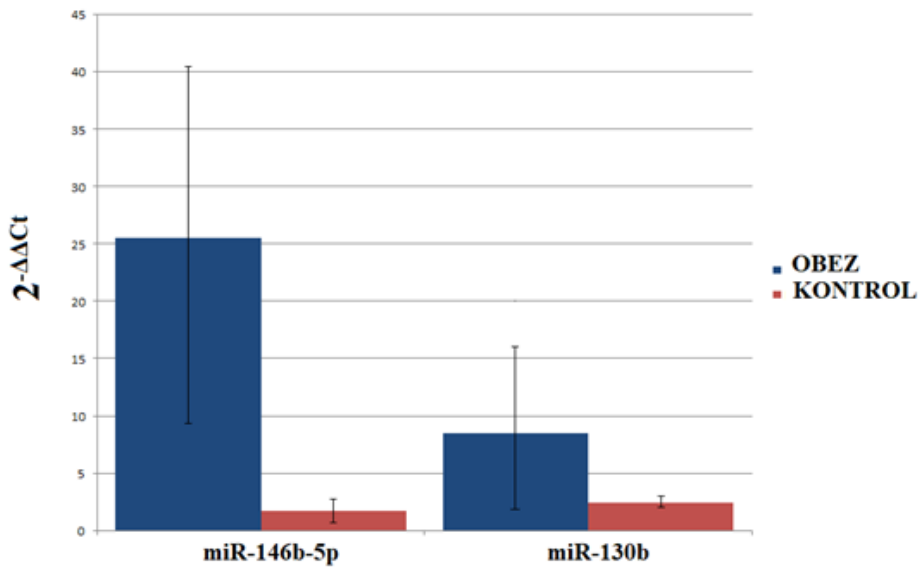
Tablo 23. Obez grubunu oluşturan çocuklarda *hsa-miR-130b* CT değerleri (SD: standart deviasyon)

CT	ΔCt	$\Delta \Delta Ct$	$2^{-\Delta \Delta Ct}$	SD
26,99	6,31	-2,5	5,65	3,288047
26,88	6,12	-2,69	6,87	4,150717
26,55	5,87	-2,94	7,67	4,716402
25,29	4,61	-4,2	18,37	11,23251
27,34	6,66	-2,15	4,76	2,658721
26,68	6	-2,81	7,01	4,249712
26,76	6,08	-2,73	6,63	3,981011
27,22	6,54	-2,27	5,23	2,991062
29,27	8,59	-0,22	2,36	0,961665
33,44	12,76	3,95	0,064	0,661852
25,73	5,05	-3,76	15,6	10,32376
26,56	5,88	-2,93	8,62	5,388154
25,48	4,8	-4,01	16,11	10,68438
28,41	7,73	-1,08	2,11	0,784889
25,08	4,4	-4,4	21,11	14,21992

Tablo 24. Obez grubunu oluşturan çocuklarda *hsa-miR-146b-5p* CT değerleri (SD: standart deviasyon)

CT	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT	SD
19,81	-0,87	-5,72	52,7	36,55742
18,93	-1,75	-6,6	97	67,88225
20,5	-0,18	-5,03	32,67	22,39407
24,04	3,36	-1,49	2,8	1,272792
22,45	1,77	-3,08	8,45	5,267946
24,18	3,5	-1,35	2,54	1,088944
25,76	5,08	0,23	0,85	0,106066
23,21	2,53	-2,32	4,99	2,821356
23,81	3,13	-1,72	3,29	1,619275
21,6	0,92	-3,93	15,24	10,0692
21,16	0,48	-4,37	20,67	13,90879
18,83	-1,85	-6,7	103,96	72,80371
23,99	3,31	-1,54	2,9	1,343503
22,51	1,83	-3,02	8,11	5,027529
21,17	0,49	-4,36	20,53	13,8098

Bu değerlendirme sonucunda obez ve kontrol grupları arasındaki *hsa-miR-146b-5p* ve *hsa-miR-130b*'nin $2^{-\Delta\Delta$ CT ortalamalarının grafiksel gösterimi Şekil 12'de verilmiştir.



Şekil 12. Obez ve kontrol grupları için $2^{-\Delta\Delta$ CT ortalamalarının grafiksel gösterimi

Hsa-miR-130b'nin ifade düzeyleri kontrol grubunun ifade düzeyleri ile istatistiksel olarak kıyaslandığında yüksek düzeyde anlamlı bir fark bulundu ($p<0.01$) Toplam 15 hastadan 14'ünde *miR-130b*'nin ifade düzeyinde artış ve 1'inde *miR-130b*'nin ifade düzeyinde azalma gözlemlendi. Obez grubunda *miR-130b*'nin ifade düzeyinde ortalama 8.5 ± 5.39 kat artış belirlendi. Obez grubunda *miR-130b*'nin ifade düzeyinde maksimum 21.11 kat artış ve 0.064 kat azalma gözlemlendi. Bu değerlendirme sonucunda *hsa-miR-130b* ifade düzeyinde gözlenen değişimlere ait sonuçlar Tablo 24'de verilmiştir.

Tablo 24. Obez grubunu oluşturan çocuklarda *hsa-miR-130b* ifade düzeyindeki değişimler

	<i>Hsa-miR-130b</i>			<i>p</i> Değeri
	Artma	Azalma	Toplam	
Obez Grubu	14	1	15	0.008556 (* $p<0.01$)
Birey Sayısı (n)				

* t-test, n:birey sayısı

Hsa-miR-146b-5p'nin ifade düzeyleri kontrol grubunun ifade düzeyleri ile istatistiksel olarak kıyaslandığında çok yüksek düzeyde anlamlı bir fark bulundu ($p<0.001$) Toplam 15 hastadan 14'ünde *miR-146b-5p*'nin ifade düzeyinde artış ve 1'inde *miR-146b-5p*'nin ifade düzeyinde azalma gözlemlendi. Obez grubunda *miR-146b-5p*'nin ifade düzeyinde ortalama 25.58 ± 17.3 kat artış belirlendi. Obez grubunda *miR-146b-5p*'nin ifade düzeyinde maksimum 103.96 kat artış ve 0.85 kat azalma gözlemlendi. Bu değerlendirme sonucunda *hsa-miR-146b-5p* ifade düzeyinde gözlenen değişimlere ait sonuçlar Tablo 25'de verilmiştir.

Tablo 25. Obez grubunu oluşturan çocuklarda *hsa-miR-146b-5p* ifade düzeyindeki değişimler

	<i>Hsa-miR-146b-5p</i>			<i>p</i> Değeri
	Artma	Azalma	Toplam	
Obez Grubu	14	1	15	0.000001 (* $p<0.001$)
Birey Sayısı (n)				

* t-test, n:birey sayısı

Rölatif normalize miRNA ekspresyon seviyelerindeki değişim $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplandığı için, grafikler X-koordinatıyla bağlantısız ve 2^0 değeri esas alınarak

izilmiřtir. $2^0 = 1$ 'in üzerindeki değerler miRNA gen ifadesindeki artışı, 1'den küçük ($2^{-1} = 0.5$ gibi) değerler ise miRNA gen ifadesindeki azalmayı göstermektedir.



5. TARTIŞMA

Obezite; gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde hızla artmakta ve DSÖ tarafından önemli sağlık sorunlarına sebep olan en riskli 10 hastalıktan biri olarak kabul edilmektedir. Obezitedeki artış bu şekilde devam ederse, 2050 yılında çocukların %25'i, kadınların %40'ı, erkeklerin %60'ının obez olacağı tahmin edilmektedir (Narayanaswami ve Dwoskin, 2017). Mortalitesi yüksek hastalıkların oluşmasına ve yaşam kalitesinin düşmesine sebep olan obezite, yetişkinler kadar çocukluk çağındaki bireyleri de etkilemektedir. Obezite sıklığında artış, obeziteye bağlı komplikasyonların daha sık ve daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Çocukluk çağında başlayan obezitenin yetişkin dönemde de sürmesi, obeziteli yaşam süresinin uzaması erişkin dönemdeki morbidite ve mortaliteyi artırmaktadır. Beş yaşından küçük 41 milyon çocuk, 5-19 yaş arası 340 milyondan fazla çocuk ve adolesan obez bulunmuştur (Usanma, 2017). Çocuk ve adolesanlarda da yaygınlaşmış olan bu epidemi, gün geçtikçe dünya nüfusunun büyük bir kısmını etkileyen bir morbidite ve mortalite sebebi haline gelmektedir. Bu sebeple; obeziteden korunmanın yanı sıra yeni ve etkili tedavi seçenekleri oluşturabilmek açısından bireysel yaklaşımlar önem kazanmaktadır. Yakın zamana kadar bireysel farklılıkların sorumlusu olarak genetik özellikler bilinmekteyken, artık çevresel faktörlerin harekete geçirdiği epigenetik mekanizmaların da patogeneizde önemli bir rol oynadığı, gerek hayvan deneyleri gerekse tek yumurta ikizlerinde yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkmaktadır (Usanma ve ark., 2017). Bu bağlamda, birçok farklı bilim dalında obezitenin nedenleri, meydana geliş mekanizması ve bu sorunu önlemek adına alınabilecek tedbirler üzerine araştırmalar hız kazanmaktadır.

Obezite multifaktöriyel etki ile oluşmaktadır. Çevresel faktörler tarafından meydana gelen epigenetik değişiklikler, obezite, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi metabolik bozukluklar ile ilişkili bulunmuştur (Huang ve ark., 2015). DNA modifikasyonu (metilasyon), histon modifikasyonu (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, S-nitrosilasyon, sumolasyon, ubukitinasyon) ve post-transkripsiyonel olarak kodlama yapmayan RNA (miRNA)'ların gen ifadesini değiştirmeleri ile epigenetik etkiler meydana gelmektedir. Obeziteye neden olduğu belirlenen epigenetik etkiler obezitenin önlenmesinde yeni tedavi seçenekleri sunabilecek biyobelirteçler olarak kullanılabilir.

Çalışmamızda obez ve sağlıklı kontrol grubu çocuklarda, MS-PZR yöntemi ile *HIF3A* ve *IL-6* genlerinin genlerinin promotör metilasyonlarının analizi yapıldı. Böylece obezitenin erken tanı ve tedavi seçeneklerini arttırabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi amaçlandı.

Obezite ve adiposit dokunun büyümesiyle adipositlere giden kan miktarının azalması neticesinde hipoksi meydana gelmektedir. Adipositler boyut olarak genişledikçe, komşu hücrelerle ve hücre dışı matris bileşenleriyle temasları arttıkça artan mekanik stres yaşarlar ve oksijen difüzyon sınırlarına yaklaşan boyutlara geldikçe hipoksi oluşur. Hipertrofik adipositlerin artan mekanik ve hipoksik stresleri yağ dokusu iltihabına katkıda bulunur (Ghaben ve Scherer, 2019). Adipoz dokuda oluşan hipoksi; kan akımı ve kapiller yoğunluktaki azalma ile ilişkili fizyolojik bir temele dayanabilir. Yapılan çalışmalarda obezitede adipoz doku kan akışında azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir (Summers ve ark., 1996; Karpe ve ark., 2002). Obezlerde, adipoz doku kan akışının obez olmayan bireylere oranla %30-40 daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Bolinder ve ark., 2000). Hipoksi, leptin düzeyinde artışa, adiponektin düzeyinde azalmaya, yağ dokusuna makrofaj infiltrasyonuna, adipositlerin nekrozuna ve adipositlerdeki NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerini aktifleştirerek proinflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimine yol açarak yağ dokusunda lokalize bir inflamasyona sebep olmaktadır (Ye ve McGuinness, 2013; Trayhurn ve Wood, 2004). *HIF3A* geninin metilasyonunun VKİ ve adipozite ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. *HIF3A* bir β alt birim (HIF- β) ve üç α alt birimin (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) birinden oluşur ve hücrede azalan oksijen konsantrasyonu ve fizyolojik seviyelerine yanıtı düzenler (Wang ve ark., 2015). HIF3 α bağımsız olarak veya HIF1 α ile birlikte çalışarak bazı hedef genleri aktive edebildiğinden, glikoz ve amino asit metabolizması, apoptoz, proteoliz, p53 sinyalizasyonu ve PPAR sinyalizasyonunda HIF3 α 'nın rol oynadığı düşünülmektedir (Pfeiffer ve ark., 2016). Buna ek olarak, HIF3 α 'nın adiposit farklılaşmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Pfeiffer ve ark., 2016). HIF-3 α diğer α alt üniteleri kadar ayrıntılı olarak araştırılmamıştır, ancak genellikle HIF-1 α ve HIF-2 α 'nın negatif bir düzenleyicisi olarak kabul edilir (Wang ve ark., 2015). Çalışmamız, obezite ile ilişkili bu genin Orta Karadeniz Bölgesindeki obez çocuklarda promotör bölge metilasyonlarının araştırıldığı ilk çalışmadır.

Bu çalışmada, *HIF3A* geni için sıklığı obez ve kontrol grubunda metilasyon gözlenmedi. *IL-6* geni için metilasyon sıklığı obez grupta 93.6 (46/49), kontrol grubunda %100 (49/49) olarak belirlendi. Obez ve kontrol grubundaki *HIF3A* promotör bölge metilasyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Obez grubundaki *IL-6* geni promotör bölge metilasyonları ile kontrol grubu kıyaslandığında 3 hastada *IL-6* gen promotöründe unmetilasyon tespit edildi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Genom çaplı epigenetik analiz çalışmalarında (EWAS), *HIF3A*'nın VKİ veya VKİ değişikliği ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Wang ve ark., 2015). Çin'deki bir çalışmada 7-17 yaş arası 110 obez ve 110 sağlıklı kontrol çocuğun *HIF3A* gen lokusunda, kandan DNA metilasyon seviyelerinin ölçümü yapılmıştır. Obez çocuklarda kontrol grubuna göre *HIF3A* geninin 46801642 ve 46801699 pozisyonlarında anlamlı derecede yüksek metilasyon düzeyleri gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2015). Tüm epigenom ilişkili periferik kan lökosit izolasyonu ile yapılan bir çalışmada *HIF3A* geni intron 1 deki 3 CpG bölgesinde (cg27146050, cg16672562, cg22891070) VKİ ile önemli derecede ilişkili DNA metilasyonu gözlemlenmiştir (Dick, 2014). Çalışmamızda sadece *HIF3A* geni promotör bölgede metilasyon durumu incelenmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu bölgenin metilasyonunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Kadınlara ait adipoz dokular ile yapılan başka bir çalışmada metilasyon farklılıkları bulunmuştur (Holbrook, 2016). Adipoz dokuda *HIF-3A* mRNA ekspresyonu ve CpG bölge metilasyonu ve de *HIF-3A*'nın genetik varyantları adipoz doku dağılımı ve fonksiyonu ile ilişkilidir (Pfeiffer ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada, 603 kişiden alınan subkutanoz ve visseral adipoz doku örneklerinde *HIF-3A* mRNA ekspresyonu ve 87 örnekte CpG bölge metilasyonu bakılmıştır. Subkutanoz adipoz doku, visseral adipoz doku ile karşılaştırıldığında, *HIF-3A* mRNA ekspresyonu anlamlı derecede yüksektir. Visseral adipoz doku, subkutanoz adipoz doku ile karşılaştırıldığında, cg22891070'deki *HIF3A* metilasyonu anlamlı derecede yüksektir ve VKİ ile ilişkili bulunmuştur (Pfeiffer ve ark., 2016). HIF yollarının obezitede adipoz doku disfonksiyonunun gelişiminde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir (Pfeiffer ve ark., 2016). Adipoz doku biyopsisi girişimsel olarak temin edilebilmektedir ve çocukta bu dokunun alımındaki zorluktan dolayı çalışmamızda periferik kan tercih edildi. Çalışmamızda *HIF3A* geni promotor bölge metilasyon profili açısından

değerlendirildiğinde obez ve kontrol grubu çocuklarda metilasyon gözlenmedi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Main ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, VKİ kanda bir CpG bölgesinde *HIF3A* metilasyonu ile ilişkili bulunmuştur ve bireylerde farklı bir CpG bölgesinde kan ve subkutan adipoz doku (SAD) metilasyon düzeyleri arasında pozitif ilişki gözlenmiştir. SAD metilasyon düzeyi *HIF3A* gen ekspresyonu ile korele değildir. İlginç olarak, SAD'da *HIF3A* ifadesi, VKİ ve tüm vücut insülin direnci ile negatif ilişkili bulunmuştur.

IL-6; mononükleer fagositler, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreleri ile bazı aktive T hücreleri tarafından sentez edilir. Kodlanmış proteinin, otoimmün hastalıkları veya enfeksiyonları olan kişilerde ateşi tetikleyebilen endojen bir pirojen olduğu gösterilmiştir (NCBI, 2019). Protein birincil olarak akut ve kronik enflamasyon bölgelerinde üretilir, burada serum içine salgılanır ve interlökin 6 reseptörü alfa yoluyla transkripsiyonel bir inflamatuvar tepkiyi indükler. Bu genin işleyişi, diabetes mellitus ve sistemik juvenil romatoid artrit şüphesi de dahil olmak üzere çok çeşitli inflamasyonla ilişkili hastalık durumlarında görülür (NCBI, 2019). Obezitenin düşük derecede kronik inflamasyon ve insülin direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Cerdo ve ark., 2019). Beyaz adipoz doku, metabolik olarak en önemli adipoz dokudur, inflamasyon durumunda merkezi bir rol oynar ve TNF- α ve interlökinler IL -1, IL-6, IL-10 ve IL-12 gibi pro-inflamatuvar sitokinleri eksprese eder (Cerdo ve ark., 2019). Obezitede, beyaz adipoz dokuda sitokin üretimi artmıştır ve sırayla pro-inflamatuvar sitokinleri artıran ve daha sonra insülin direncini indükleyen makrofajlarda artmıştır (Cerdo ve ark., 2019). Obezlerde resistin, adiponektin, ghrelin, leptin, C-Reaktif Protein (CRP), interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktör (TNF- α), fibrinojen gibi inflamasyon belirteçlerin insülin direnci ve kardiyovasküler risk faktörleri ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (Koçak ve ark., 2014). Obezlerde IL-6 düzeylerinin artmış olmasını açıklayabilecek mekanizma yağ dokusunun IL-6 üretip salgılayabilme özelliğine bağlanabilir (Koyuer, 2005). Dolaşımdaki IL-6, doku hasarı ve enfeksiyonu, patojen içeren hücreleri elimine etme, inflamatuvar doku onarımını başlatma ve hepatik akut faz yanıtının kontrolde tek başına en önemli faktördür (Wisse, 2004). Na ve ark. (2015) Koreli kadınlarda periferik kandan yaptıkları çalışmada *IL-6* gen promotöründe anormal DNA metilasyonu gözlenmişlerdir ve bunun obezitenin

etioloji ve patogenezinde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Koçak ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada obez olan ve olmayan bireylerde insülin direnci ile interlekin-6, leptin, CRP ve fibrinojen ilişkisi araştırılmış ve IL-6 ile obezite arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Kanda mevcut IL-6 konsantrasyonunun yaklaşık %15-35'inin adipoz doku kaynaklı olduğu düşünülmektedir, yapılan çalışmalar sonucu IL-6 düzeyleri oldukça farklı bulunmuştur. Farklılığa neden olan bir faktör de IL-6 düzeylerinde sirkadiyen ritim görülmesidir. Subkutan adipoz doku tarafından IL-6'nın salınım miktarı, akşam saatlerinde öğlene kıyasla daha fazladır. IL-6'nın obezlerde salınımının daha çok olması, IL-6'nın vücut ağırlığı ve lipid metabolizmasında düzenleyici bir rol aldığını göstermektedir (Eder ve ark., 2009). Çoğu çalışmada bariatrik cerrahi sonrası IL-6'nın azaldığı bildirilse de (Sdralis ve ark., 2013), herhangi bir değişimin görülmediği yönünde bulgular da bulunmaktadır (Abdenmour ve ark., 2014). Çalışmamızda *IL-6* geni promotor bölge metilasyon profili açısından çocuk obez ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Bunun yanında, *IL-6* geni promotor metilasyon analiz sonuçları obez grubu klinik parametrik grupları ile karşılaştırıldığında, LDL, HDL, trigliserit, total kolesterol, insulin, Homa-IR, AST, ALT değerleriyle istatistiksel olarak bir ilişki göstermezken, yüksek glukoz değeri ile *IL-6* geni promotor metilasyon durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($p<0.05$). Yapılan çalışmalarda dolaşımdaki IL-6 konsantrasyonları açlık insülini, açlık glukozu, fasting insülin resistance index gibi insülin direnci göstergesi parametrelerle ilişkili bulunmuştur (Bastard ve ark., 2000). IL-6'nın insülin direnci meydana getirme mekanizması tam bilinmemektedir fakat plazmada serbest yağ asidinin artması ve yağ oksidasyonu, yağ dokusu lipoprotein lipaz aktivitesinin azalması gibi fizyolojik değişikliklerin IL-6 ile ortaya çıkabileceği görülmüştür. Bunlar insülinin tersi etkilerdir ve böylece insülinin etkisini bozarlar. Yine insülinin hepatik glikojen metabolizması üstündeki etkilerine IL-6'nın ters etki ettiği görülmüştür ve IL-6 glisemiye arttırdığı rapor edilmiştir (Koyuer, 2005).

Obez ve zayıf kadınlarda abdominal subkutanöz adipoz doku ve plazmada *miR-130a* ve *miR-130b* ekspresyonları karşılaştırıldığında obezlerde daha düşük seviyede bulunmuştur (Lacomino ve Siani, 2017). Buna karşılık, dolaşımdaki *miR-130b* 'nin obez çocuklarda daha yüksek olduğu görülmüştür (Lacomino ve Siani, 2017).

Çalışmamız sonucunda, *miR-130b*'nin ifade düzeylerinde, kontrole göre yüksek düzeyde anlamlı bir fark bulundu ($p<0.01$) Toplam 15 hastadan 14'ünde *miR-130b*'nin ifade düzeyinde artış ve 1'inde *miR-130b*'nin ifade düzeyinde azalma tespit edildi. *MiR-130b*; TD2, obezite, kalp yetmezliği, hipertansiyon ve ateroskleroz dahil metabolik hastalıklarla ilişkili genleri hedef almaktadır. Wang ve ark. (2013) aşırı kilo, hipertriaglisideremi ve metabolik sendrom için *miR-130b*'yi potansiyel biyolojik marker olarak belirlemiştir. İnsanda olgunlaşmış 3T3-L1 adipositlerine kültür ortamında, TGF- β eklenmesinin *miR-130b*'nin seviyesini arttırdığı ve bu miRNA'nın adipogenez sırasında adiposit farklılaşmasında rol oynadığı gözlenmiştir (Lacomino ve Siani, 2017). Obez bireylerde dolaşımdaki *miR-130b* seviyesi yüksek bulunmuştur (Lacomino ve Siani, 2017). Son zamanlarda, TGF- β sinyal yolunun vücut enerji homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Wang ve ark., 2013). Çalışmalarda yağ dokularından salgılanan *miR-130b*'nin TGF- β 'nin metabolik düzenleyici etkisine aracılık ettiği öne sürülmektedir. Yapılan çalışmalarda TGF- β 'nin adipositlerden *miR-130b* salgılanmasını uyarabileceği öne sürülmektedir. İskelet kası içindeki azalmış oksidatif kapasite, Tip 2 diyabet de dahil olmak üzere metabolik hastalık gelişme riskini artırır. PGC-1 α oksidatif kapasitenin kontrolünde önemli bir rol oynar ve Tip 2 diyabetli hayvan modelinin iskelet kasında baskılanır. Yapılan çalışmada dolaşımdaki *miR-130b*, alıcı miyositlerde PGC-1 α mRNA seviyelerini azaltabildiği bu da kas oksidatif kapasitesinin azalmasına böylece metabolik sendrom veya tip 2 diyabetin patogenezi hızlanmasına neden olabileceği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2013).

MiR-146b'nin, insan visceral preadiposit proliferasyonunun ve farklılaşmasının yeni bir düzenleyicisi olduğu keşfedilmiştir. *miR-146b*, adipojenik farklılaşma sırasında yavaş yavaş eksprese edildiği ve sadece hücre çoğalmasını inhibe etmekle kalmayıp, aynı zamanda hücre farklılaşmasını da teşvik ettiği gözlenmiştir. Çalışmamızda *miR-146b-5p*'nin ifade düzeyleri kontrol grubunun ifade düzeyleri ile istatistiksel olarak kıyaslandığında çok yüksek düzeyde anlamlı bir fark bulundu ($p<0.001$). Toplam 15 hastadan 14'ünde *miR-146b-5p*'nin ifade düzeyinde artış ve 1'inde *miR-146b-5p*'nin ifade düzeyinde azalma gözlemlendi. *miR-146b* ekspresyonu, aşırı kilolu ve obez insanlarda ve HFD farelerinde artmış olarak gözlenmiştir. Bu bulgular, *miR-146b*'nin insan visceral preadipositlerinde adipogenezin pozitif düzenleyicisi olarak görev yaptığını

göstermektedir. *MiR-146b*'nin Kruppel benzeri faktör 7 (KLF7) ekspresyonu üzerindeki inhibitör etkileri ve deneysel olarak insan visceral adipositlerinde KLF7'nin *miR-146b*'nin doğrudan hedefi olduğu ateş böceği lusiferaz raportör gen testi ile gösterilmiştir (Chen ve ark., 2018). İnsan preadipositlerinde veya 3T3-L1 preadipositlerinde KLF7'nin aşırı ekspresyonu, adipogenezi baskılar ve adipogenik transkripsiyon faktörleri C / EBP α ve PPAR γ ve AP2 geni gibi adiposit marker genlerinin ekspresyonunu inhibe eder (Kanazawa ve ark., 2005; Kawamura ve ark., 2006). Ayrıca KLF7, olgun adipositlerde adipositokin gen ekspresyonunu düzenleyerek, pankreas beta hücrelerinde insülin sekresyonunu inhibe ederek ve kas hücrelerinde heksokinaz 2 gen ekspresyonunu baskılayarak, farklı dokulardaki farklı mekanizmalarla insülin duyarlılığını etkiler (Kawamura ve ark., 2006). Japonlardan oluşan büyük bir deney grubuyla yapılan SNP analizi, KLF7'nin T2D patogenezinde etkili olduğunu göstermiştir (Kanazawa ve ark. 2005). Ayrıca yeni bir KLF7 SNP varyantının, Danimarka popülasyonunu obeziteye karşı koruyabileceği bildirilmiştir (Zobel ve ark., 2009). Bununla birlikte, adipogenezde KLF7 düzenlemesinin yukarı yönde akış mekanizmaları bilinmemektedir. *miR-146b*'nin adiposit proliferasyonu ve farklılaşması sırasında KLF7'nin negatif bir regülatörü olduğunu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2018). Obez bireylerin yağ dokuları inflamasyon durumu yaratabilir (Rausch ve ark., 2008; Trayhurn ve ark., 2008) ve adipositler, adipoz dokuda makrofaj infiltrasyonunu ve aktivasyonunu uyaran monosit kemoatrakt protein-1 (MCP-1) dahil olmak üzere birkaç proinflamatuvar sitokin üretiminde rol oynarlar. (Sell ve Eckel, 2007). Makrofajlar, insan olgun adipositlerinde *miR-146b* ekspresyonunu indükleyebilen inflamatuvar sitokinler TNF- α ve IL-6'nın (Finucane ve ark., 2012) önemli bir kaynağıdır (Shi ve ark., 2014). Eğer gerçekten *miR-146b*, preadipositlerin olgun adipositlerde proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekleyebilirse, *miR-146b* ekspresyonu, artmış lipid birikimi ve artmış obezite yeteneğine sahip yağ dokularına yol açacaktır. Bu artan yağ dokusu hacmi, inflamatuvar faktörlerin salgılanmasını artırır. Böylece, *miR-146b* ile obezite ve metabolik fonksiyon bozukluğunu şiddetlendirecek inflamatuvar sitokinler arasında pozitif bir geri besleme döngüsü mevcut olduğu varsayılabilir (Chen ve ark., 2018). Cui ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada dolaşımdaki ekspresyonu obez çocuklarda ve yetişkin T2D hastalarında en belirgin şekilde artmış olan üç miRNA'yı (*miR-486*, *miR-146b* ve *miR-15b*) seçmişlerdir. *miR-146b* ve *miR-*

15b, pankreatik insülin sekresyonuyla indüklenen yüksek konsantrasyonlu glukozun baskılanmasına neden olmuş ve obezite ve TD2'nin patolojik sürecine katkıda bulunmuştur. Sonuçta, dolaşımdaki miRNA'ların, özellikle *miR-486*, *miR-146b* ve *miR-15b*'nin obez çocuklarda T2D'nin gelecekte riskini oluşturma rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. Çocukluk çağındaki obezite, yetişkinlikte T2D duyarlılığını artırır (Cui ve ark., 2018). Sharma ve ark. (2015) yağ dokularında *miR-146a* ve *miR-146b* ekspresyonunun VKİ ile anlamlı şekilde pozitif korelasyon gösterdiğini doğrulamıştır. Son bulgular adipoz dokudaki yağ hücrelerinin sayı ve hacmindeki artışın obezite ile sonuçlandığını göstermiştir. Çocukluk döneminde anormal adiposit proliferasyonu, yetişkinlikte obezite gelişimine katkıda bulunur. Bu nedenle, bu bulgular *miR-486* ve *miR-146b*'nin çocuklarda obezite oluşumuna önemli katkılarda bulunabileceğini göstermektedir (Cui ve ark., 2018). Yapılan bir çalışmada obez farelerde *miR-146b*'yi 3 gün boyunca yıkmak için *anti-miR-146b* uygulanmış ve bu farelerin, kilo kaybettiklerini ve herhangi bir hepatotoksisite kanıtı olmadan metabolik bozukluklarında iyileşme sergilediklerini bulmuşlardır (Ahn et al., 2013). Bu sonuç, *miR-146b*'nin obezitenin tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, *miR-146b*'nin in vivo aktivitesini azaltma çalışmaları yapılırken, insan monositlerindeki anti-inflamatuar etkisi dikkate alınmalıdır. *miR-146b*, KLF7 genini hedef alarak insan visceral preadiposit proliferasyonunun ve farklılaşmasının yeni bir düzenleyicisi olarak işlev görür. *Mir-146b*, obez deneklerde zayıf olanlara göre visceral yağ dokularında önemli ölçüde artmış olarak eksprese edilir ve obezite ve metabolik sendroma karşı terapötik bir hedef olabilir.

Çalışmamızda bireylerden doku elde etmedeki pratik zorluklar nedeniyle, metilasyon düzeyleri, doğrudan ilk olarak etkilenen adipoz dokudan değil, periferik kandan analiz edildi. Bu nedenle, sonuçlarımız adipoz metabolizma sisteminde DNA metilasyonunun direk göstergesini sağlamayabilir. Bu da çalışmamız için sınırlayıcı olmuştur. Ancak dolaşımdaki *mir-130b* ve *mir-146b* ifade düzeyleri çalışılan örnek sayısı sınırlı olmasına rağmen obez çocuklarda yüksek seviyede bulunmuştur. Bu miRNA'ların obezitenin tedavi ve önlenmesinde biyobelirteç olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda obeziteden sorumlu olabilecek *HIF3A* ve *IL-6* genlerini ve *mir-146b* ve *mir-130b*'nin obezite ile ilişkisini araştırmayı hedefledik. Obez çocuklar ve sağlıklı çocuk kontrollerde *HIF3A* ve *IL-6* genlerinin promotör metilasyon durumlarını ve *miR-146b* ve *miR-130b*'nin ekspresyon düzeylerini inceledik.

Sonuçlar değerlendirildiğinde, obez ve kontrollerdeki *HIF3A* promotör metilasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). *IL-6* geninin promotör metilasyonları açısından da obez ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). *IL-6* geni promotör metilasyon analiz sonuçları obez grubu klinik parametrik gruplarıyla karşılaştırıldığında, LDL, HDL, trigliserit, total kolesterol, insulin, Homa-IR, AST, ALT değerleriyle istatistiksel olarak bir ilişki göstermezken, yüksek glukoz değeri ile *IL-6* geni promotör metilasyon durumu istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p=0.024$). *HIF3A* geni için obez grubu klinik parametrik gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Promotör metilasyon analizleri yaptığımız *HIF3A* ve *IL-6* genlerinin obez adipoz dokuda doku spesifik olarak daha yüksek düzeyde ifade edildiği bilinmektedir. Periferik kan lökositlerinden yaptığımız çalışmamızda bu genlerin dolaşımdaki ekspresyon düzeyleri belirleyici olmamıştır. Obezlerde bu genlerle yapılacak çalışmalarda adiposit hücrelerinin kullanımı daha uygun olabilir.

Çalışmamızda obez çocuklardaki *mir-130b* ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, aralarında yüksek düzeyde anlamlı bir fark bulundu ($p < 0.01$). Obez çocuklardaki *miR-146b*'nin ifade düzeyleri kontrol grubunun ifade düzeyleri ile karşılaştırıldığında çok yüksek düzeyde anlamlı bir fark bulundu ($p < 0.001$). Bu miRNA'lar obezitenin ön tanısı ve neden olabileceği hastalıkların önlenmesinde periferik kandan kolaylıkla tespit edilebilecek biyobelirteçler olabilir.

Epigenetik belirteçler; obezite altında yatan nedenlerin anlaşılmasına katkı sağlar ve buna karşı savaşta terapötik stratejilerin gelişmesi için yeni hedefler belirler. Epigenetik değişikliklerin geri dönüşümlü olabildiği görülmektedir. Gelecekte obezite ve benzeri birçok hastalığın tetiklenmesini ya da ilerlemesini engellemede epigenetik biyobelirteçler fayda sağlayabilir.

Obezitenin tanı ve tedavi edilmesinde genetik ve epigenetik terapilerin insanda uygulanabilir hale gelmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Ayrıca benzer

Çalışmanın daha büyük ve farklı populasyonlarda yapılması sonuçların desteklenmesi açısından önemlidir.



KAYNAKLAR

- Ahn J, Lee H, Jung CH, Jeon TI, Ha TY. MicroRNA-146b promote adipogenesis by suppressing the SIRT1-FOXO1 cascade. *EMBO Mol. Med.* 2013;5:1602–1612.
- Abdenmour M, Reggio S, Le NG, Liu Y, Poitou C, Aron-Wisnewsky J. Association of adipose tissue and liver fibrosis with tissue stiffness in morbid obesity: links with diabetes and BMI loss after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:898-907.
- Al Muftah WA, Al-Shafai M, Zaghlool SB, Visconti A, Tsai PC, Kumar P, et al. Epigenetic associations of type 2 diabetes and BMI in an Arab population. *Clinical epigenetics.* 2016; 8:13.
- Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol.* 2013;92(6–7):229–36.
- Ali O, Cerjak D, Kent JW, James R, Blangero J, Carless MA, et al. Methylation of SOCS3 is inversely associated with metabolic syndrome in an epigenome-wide association study of obesity. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society.* 2016; 11:699–707.
- Altunkaynak BZ, Özbek E. Obezite: Nedenleri ve tedavi seçenekleri. *Van Tıp Dergisi* 2006;13(4):138-142.
- Altshuler-Keylin S, Kajimura S. Mitochondrial homeostasis in adipose tissue remodeling. *Sci Signal* 2017;10.
- Andersen DC, Jensen CH, Schneider M, Nossent AY, Eskildsen T, Hansen JL, Teisner B, Sheikh SP. MicroRNA-15a fine-tunes the level of delta-like 1 homolog (DLK1) in proliferating 3T3-L1 preadipocytes. *Exp Cell Res.* 2010; 316(10):1681–91.
- Annagür BB. Obezitede çeşitli risk faktörleri ve dürtüsellik. *Current Approaches In Psychiatry* 2010;2(4):572-582.
- Aouadi M, Tencerova M, Vangala P, Yawe JC, Nicoloso SM, Amano SU, Cohen JL, Czech MP. Gene silencing in adipose tissue macrophages regulates whole-body metabolism in obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(20):8278-8283, 2013.
- Arner P, Sinha I, Thorell A, Ryden M, Dahlman-Wright K, Dahlman I. The epigenetic signature of subcutaneous fat cells is linked to altered expression of genes implicated in lipid metabolism in obese women. *Clinical epigenetics.* 2015; 7:93.
- Arner P, Sahlqvist AS, Sinha I, Xu H, Yao X, Waterworth D, et al. The epigenetic signature of systemic insulin resistance in obese women. *Diabetologia.* 2016; 59:2393–405.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL. Argonaute2 complexes

- carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(12):5003–8.
- Bacos K, Gillberg L, Volkov P, Olsson AH, Hansen T, Pedersen O, et al. Blood-based biomarkers of age-associated epigenetic changes in human islets associate with insulin secretion and diabetes. *Nature communications*. 2016; 7:11089.
- Babaoğlu K, Hatun Ş. Çocukluk çağında obezite. *Sted* 2002; (11)1-2.
- Bakiner OS. Hipertansif tip 2 diyabetik olgularda telmisartan ve losartanın insülin duyarlılığı üzerine olan etkileri. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı. Ankara, Yan Dal Uzmanlık Tezi, 2007; 86:13.
- Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinology* 2014;10:24–36.
- Barres R, Kirchner H, Rasmussen M, Yan J, Kantor FR, Krook A, et al. Weight loss after gastric bypass surgery in human obesity remodels promoter methylation. *Cell reports*. 2013; 3:1020–7.
- Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, and Hainque B. Elevated levels of interleukin-6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85: 3338-3342.
- Başara R. Obeziteye bağlı risk faktörlerinin bel çevresiyle ilişkisinin incelenmesi. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı, Sivas, Doktora tezi, 2015;30-50.
- Belarbi Y, Mejhert N, Lorente-Cebrian S, Dahlman I, Arner P, Ryden M, Kulyte A. MicroRNA-193b controls adiponectin production in human white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(8):1084–8.
- Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, et al. Weight and Type 2 diabetes after bariatric surgery: Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Med* 2009;122:248-256.
- Bolinder J, Kerckhoffs DA, Moberg E, Hagstrom-Toft E, Arner P. Rates of skeletal muscle and adipose tissue glycerol release in nonobese and obese subjects. *Diabetes* 2000;49:797-802.
- Bork S, Horn P, Castoldi M, Hellwig I, Ho AD, Wagner W. Adipogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells is down-regulated by microRNA-369-5p and up-regulated by microRNA-371. *J Cell Physiol*. 2011; 226(9):2226–34.
- Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Bostrom EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Hojlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012;481 (7382):463-468.

- Bouchard L, Rabasa-lhoret R, Faraj M, Lavoie ME, Mill J, Perusse L, Vohl MC. Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr*. 2010; 91:309-20.
- Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grange C, Fonsato V, Tetta C. Exosome/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Am J Cancer Res*. 2011;1(1):98–110.
- Campion J, Milagro FI, Goyenechea E, Martinez JA. TNF-alpha promoter methylation as a predictive biomarker for weight-loss response. *Obesity*. 2009;17:1293-7.
- Campion J, Milagro FI, Martinez JA. Individuality and epigenetics in obesity. *Obes Rev*. 2009;10:383-392.
- Can İM, Aslan A. Epigenetik mekanizmalar ve bazı güncel çalışmalar. *Karaelmas Fen ve Müh. Derg*. 2016;6(2):445-452.
- Cao L, Lin EJ, Cahill MC, Wang C, Liu X, During MJ. Molecular therapy of obesity and diabetes by a physiological autoregulatory approach. *Nat Med* 2009; 15(4):447-454.
- Carmichae RE, Wilkinson KA, Craig TJ. Insulin-dependent GLUT4 trafficking is not regulated by protein SUMOylation in L6 myocytes. *Scientific Reports* 2019; 9:6477.
- Cerdo T, Antonio GS , Bermudez MG and Campoy C. The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity. *Nutrients* 2019;11:635.
- Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*. 2011;6(8):23937.
- Cheng Z, Zheng L, Almeida FA. Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2018;54:1 - 10.
- Chen H, Mo D, Li M, Zhang Y, Chen L, Zhang X, Li M, Zhou X, Chen Y. miR709 inhibits 3T3-L1 cell differentiation by targeting GSK3beta of Wnt/betacatenin signaling. *Cell Signal*. 2014;26(11):2583–9.
- Chen J, Xu L, Hu Q, Yang S, Zhang B, Jiang H. MiR-17-5p as circulating biomarkers for the severity of coronary atherosclerosis in coronary artery disease. *Int J Cardiol*. 2015;197:123–4.
- Chen L, Dai YM, Ji CB, Yang L, Shi CM, Xu GF, Pang LX, Huang FY, Zhang CM, Guo XR. MiR-146b is a regulator of human visceral preadipocyte proliferation and differentiation and its expression is altered in human obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014; 393:65-74.

- Chung WK, Belfi K, Chua M, Wiley J, Mackintosh R, Nicolson M, Boozer CN, Leibel RL. Heterozygosity for Lep(ob) or Lep(rdb) affects body composition and leptin homeostasis in adult mice. *Am J Physiol.* 1998;274(4 Pt 2):R985-90.
- Cioffi M, Vallespinos-Serrano M, Trabulo SM, Fernandez-Marcos PJ, Firment AN, Vazquez BN, Vieira CR, Mulero F, Camara JA, Cronin UP, et al. MiR-93 controls adiposity via inhibition of Sirt7 and Tbx3. *Cell Rep.* 2015;12(10): 1594–605.
- Clarke-Harris R, Wilkin TJ, Hosking J, Pinkney J, Jeffery AN, Metcalf BS, et al. PGC1alpha promoter methylation in blood at 5–7 years predicts adiposity from 9 to 14 years (EarlyBird 50). *Diabetes.* 2014; 63:2528–37.
- Comer BS, Mariam B, Cherie A, S, William TG. Epigenetic targets for novel therapies of lung diseases. *Pharmacology & Therapeutics* 2015;(147) 91-110.
- Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(6):703-11.
- Cui X, You L, Zhu L, Wang X, Zhou Y, Li Y, Wen J, Xia Y, Ji C, Guo X. Change in circulating microRNA profile of obese children indicates future risk of adult diabetes. *Metabolism Clinical and Experimental* 2018; 78:95–105.
- Dayeh T, Volkov P, Salo S, Hall E, Nilsson E, Olsson AH, et al. Genome-wide DNA methylation analysis of human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS genetics.* 2014; 10:e1004160.
- Dayeh T, Tuomi T, Almgren P, Perfilyev A, Jansson PA, de Mello VD, et al. DNA methylation of loci within ABCG1 and PHOSPHO1 in blood DNA is associated with future type 2 diabetes risk. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society.* 2016; 11:482–8.
- Deiuliis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes.* 2016;40(1):88–101.
- De Mello VD, Matte A, Perfilyev A, Mannisto V, Ronn T, Nilsson E, et al. Human liver epigenetic alterations in non-alcoholic steatohepatitis are related to insulin action. *Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society.* 2017;12(4):287-295.
- Demerath EW, Guan W, Grove ML, Aslibekyan S, Mendelson M, Zhou YH, et al. Epigenomewide association study (EWAS) of BMI, BMI change and waist circumference in African American adults identifies multiple replicated loci. *Hum Mol Genet.* 2015; 24:4464–79.
- Di Pasquale G, Dicembrini I, Raimondi L, Pagano C, Egan JM, Cozzi A, Cinci L, Loreto A, Manni ME, Berretti S, Morelli A, Zheng C, Michael DG, Maggi M, Vettor R, Chiorini JA, Mannucci E, Rotella CM. Sustained exendin-4 secretion

- through gene therapy targeting sali- vary glands in two different rodent models of obesity/type 2 diabetes. *PLoS One* 2012;7(7):e40074.
- Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, Sandling JK, Aissi D, Wahl S, Meduri E, Morange PE, Gagnon F, Grallert H, Waldenberger M, Peters A, Erdmann J, Hengstenberg C, Cambien F, Goodall AH, Ouwehand WH, Schunkert H, Thompson JR, Spector TD, Gieger C, Tregouet DA, Deloukas P, Samani NJ. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet*, 2014;383(9933): 1990-1998.
- Dönmez N, Yıldırım M, Arslan P. Obezite ve Kanser.
<https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/t45>, 2008.
- Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflammation Research* 2009;58(11):727-36.
- Ensembl. hsa-mir-130b, hsa-mir-146b-5p.
<http://www.ensembl.org>, 2019.
- Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, Koo S, Perera RJ, Jain R, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2004;279(50):52361–5.
- Finucane OM, Reynolds CM, Mc Gillicuddy FC, Roche HM. Insights into the role of macrophage migration inhibitory factor in obesity and insulin resistance. *Proc. Nutr. Soc.* 2012;71:622–633.
- Fischer-Posovszky P, Roos J, Kotnik P, Battelino T, Inzaghi E, Nobili V, Cianfarani S, Wabitsch M. Functional significance and predictive value of microRNAs in pediatric obesity: tiny molecules with huge impact? *Horm Res Paediatr*. 2016;86(1):3–10.
- Flowers E, Froelicher ES, Aouizerat BE. MicroRNA regulation of lipid metabolism. *Metabolism* 2013; 62:12-20.
- Ford J, Ahmed S, Allison S, Jiang M, Milner J. JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J* 2007; 26(7):1913-1923.
- Ford Nicole D, Patel Shivani A, ve Narayan KM. Obesity in Low- and Middle-Income Countries: Burden, Drivers, and Emerging Challenges. *Annu. Rev. Public Health* 2017; 38:145–64.
- Fujiki K, Kano F, Shiota K, Murata M. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. *BMC Biol*. 2009; 7:38
- Gao D ve Liu D. Gene therapy for obesity: progress and prospects. *Discovery Medicine*. 2014;17(96):319-28.

- Gao M, Tong Y, Gao X, Yao W. PEGylation-aided refolding of globular adiponectin. *World J Microbiol Biotechnol* 2013;29(8):1525-1530.
- Gerin I, Bommer GT, McCoin CS, Sousa KM, Krishnan V, MacDougald OA. Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(2):E198–206.
- Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2019;20:242–258.
- Gillberg L, Jacobsen SC, Ronn T, Brons C, Vaag A. PPARGC1A DNA methylation in subcutaneous adipose tissue in low birth weight subjects--impact of 5 days of high-fat overfeeding. *Metabolism*. 2014; 63:263–71.
- Grasedieck S, Sorrentino A, Langer C, Buske C, Dohner H, Mertens D, Kuchenbauer F. Circulating microRNAs in hematological diseases: principles, challenges, and perspectives. *Blood* 2013;121(25):4977–84.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual Review of Immunology* 2011; 29:415-445.
- Göktaş MA. Çocuklarda obezite tedavisinde metformin ve tiamin uygulanmasının insülin direnci üzerine etkilerinin araştırılması. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı. Kayseri. Tıpta Uzmanlık Tezi. 2014;35-42.
- Göktaş Z, Besler HT. Obezite, insülin direnci ve bazı adipokinler. *Bes Diy Derg* 2015;43(3):251-257.
- Görgişen G. İnsülin direncinde insülin reseptör substrat 1(IRS1) proteininin rolü. *Bozok Tıp Dergisi* 2018;(3):114-121.
- Gözel Nevzat, Faruk KILINÇ. Obezite ve Metabolik Sendrom. *Fırat Tıp Dergisi/Fırat MedJ*. 2018;23:18-21.
- Gu T, Gu HF, Hilding A, Sjöholm LK, Ostenson CG, Ekstrom TJ, et al. Increased DNA methylation levels of the insulin-like growth factor binding protein 1 gene are associated with type 2 diabetes in Swedish men. *Clinical epigenetics*. 2013; 5:21.
- Guay C, Regazzi R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(9):513–21.
- Guo Y, Chen Y, Zhang Y, Zhang Y, Chen L, Mo D. Up-regulated miR-145 expression inhibits porcine preadipocytes differentiation by targeting IRS1. *Int J Biol Sci*. 2012;8(10):1408–17.
- Gutierrez-Juarez R, Pocai A, Mulas C, Ono H, Bhanot S, Monia BP, Rossetti L. Critical role of stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) in the onset of diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116(6):1686-1695.
- Güçlü-Geyik F, Erginel-Ünaltuna N. Obezitede epigenetik mekanizmalar. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2013; 7-16.

- Gültürk S, Demirkazık A. Leptin ve Diyabet. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2007;29 (1): 35-40.
- Günel T . gen anlatımının kantitatif analizi “real-time pcr” quantitative analysis of gene expression “real-time pcr”. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007; 27:763-767.
- Hamam D, Ali D, Vishnubalaji R, Hamam R, Al-Nbaheen M, Chen L, Kassem M, Aldahmash A. Alajez NM: microRNA-320/RUNX2 axis regulates adipocytic differentiation of human mesenchymal (skeletal) stem cells. Cell Death Dis. 2014;5:1499.
- Heneghan HM, Miller N, McAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(5):846–50.
- Hitit M , Kurar E, Güzeloğlu A. MikroRNA biyogenezi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 2015;10(3):211-218.
- Holbrook JD. Does diet interact with genotype to cause epigenetic modification of angiogenesis genes, on the trajectory to obesity? Epigenomics 2016;1750-1911.
- Horvath S, Erhart W, Brosch M, Ammerpohl O, von Schonfels W, Ahrens M, et al. Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111:15538–43.
- Houde AA, Legare C, Biron S, Lescelleur O, Biertho L, Marceau S, et al. Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women. BMC medical genetics. 2015; 16:29.
- HSGM. Obezitenin tedavisi.
http://hsgm.saglik.gov.tr/tr/obezite/obezitenin_tedavisi.html, 2017.
- Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. Stem Cells. 2010;28(2):357–64.
- Huang RC, Garratt ES, Pan H, Wu, Y, Davis, EA, Barton SJ, Burdge GC, Godfrey KM, Holbrook JD ve Lillycrop KA. Genome-wide methylation analysis identifies differentially methylated CpG loci associated with severe obesity in childhood. Epigenetics 2015; 10(11):995-1005.
- Huang S, Wang S, Bian C, Yang Z, Zhou H, Zeng Y, Li H, Han Q, Zhao RC. Upregulation of miR-22 promotes osteogenic differentiation and inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by repressing HDAC6 protein expression. Stem Cells Dev. 2012; 21(13):2531–40.
- Hulsmans M, De Keyzer D, Holvoet P. MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis. FASEB J. 2011; 25(8):2515–27.

- Hulsmans M, Dooren EV, Mathieu C, Holvoet P. Decrease of miR-146b-5p in Monocytes during Obesity Is Associated with Loss of the Anti-Inflammatory but Not Insulin Signaling Action of Adiponectin. *Plosone* 2012; 7(2):1-10.
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Bum P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*. 1997; 10;88(1):131-41.
- Irvin MR, Zhi D, Joehanes R, Mendelson M, Aslibekyan S, Claas SA, et al. Epigenome-wide association study of fasting blood lipids in the Genetics of Lipid-lowering Drugs and Diet Network study. *Circulation*. 2014; 130:565–72.
- Itateyama E, Chiba S, Sakata T, Yoshimatsu H. Hypothalamic neuronal histamine in genetically obese animals: its implication of leptin action in the brain. *Exp Biol Med* 2003; 228(10): 1132-1137.
- İzmirli M. Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi* 2013; 20(1): 48-51.
- Jablonka E, Lamb M. Transgenerational epigenetic Inheritance. In: Pigliucci M, Müller GB, editors. *Evolution, The Extended Synthesis*. 1st Ed., Cambridge, MIT Press. 2010;137-174.
- Jeong BC, Kang IH, Hwang YC, Kim SH, Koh JT. MicroRNA-194 reciprocally stimulates osteogenesis and inhibits adipogenesis via regulating COUP-TFII expression. *Cell Death Dis*. 2014;5:1532.
- Ji HL, Song CC, Li YF, He JJ, Li YL, Zheng XL, Yang GS: miR-125a inhibits porcine preadipocytes differentiation by targeting ERR α . *Mol Cell Biochem*. 2014;395(1–2):155–65.
- Jourdan T, Godlewski G, Cinar R, Bertola A, Szanda G, Liu J, Tam J, Han T, Mukhopadhyay B, Skarulis MC, Ju C, Aouadi M, Czech MP, Kunos G. Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nat Med* 19(9):1132-1140, 2013.
- Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):6184–223.
- Kalan I, Yeşil Y. Obezite ile ilişkili Kronik Hastalıklar. *MİSED Türk Eczacıları Birliği Yayını/Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi* 2010; 23: 78-81.
- Kammoun HL, Kraakman MJ, Febbraio MA. Adipose tissue inflammation in glucose metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 2014;15(1):31–44.
- Kanazawa A, Kawamura Y, Sekine A, Iida A, Tsunoda T, Kashiwagi A, Tanaka Y, Babazono T, Matsuda M, Kawai K, Iizumi T, Fujioka T, Imanishi M, Kaku K, Iwamoto Y, Kawamori R, Kikkawa R, Nakamura Y, Maeda S. Single nucleotide

- polymorphisms in the gene encoding Kruppel-like factor 7 are associated with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005;48:1315–1322.
- Kandasamy AD, Sung MM, Boisvenue JJ, Barr AJ, Dyck JR. Adiponectin gene therapy ameliorates high-fat, high-sucrose diet-induced metabolic perturbations in mice. *Nutr Diabetes* 2:45, 2012.
- Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):2271–6.
- Karpe F, Fielding BA, Ilic V, Macdonald IA, Summers LK, Frayn KN. Impaired postprandial adipose tissue blood flow response is related to aspects of insulin sensitivity. *Diabetes* 2002;51:2467-2473.
- Kawamura Y, Tanaka Y, Kawamori R, Maeda S. Overexpression of Kruppel-like factor 7 regulates adipocytokine gene expressions in human adipocytes and inhibits glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cell line. *Mol. Endocrinol.* 2006;20:844–856.
- Kay JP, Alemzadeh R, Langley G, et al. Beneficial effects of metformin in normoglycemic morbidly obese adolescents. *Metabolism* 2001;50:1457-1461.
- Khuri SF, Najjar SF, Daley J, et al. VA National Surgical Quality Improvement Program. Comparison of surgical outcomes between teaching and non-teaching hospitals in the Department of Veterans Affairs. *Ann Surg* 2001;234:370-382.
- Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem Cells.* 2009;27(12):3093–102.
- Kim YK. Extracellular microRNAs as biomarkers in human disease. *Chonnam Med J.* 2015;51(2):51–7.
- Kinoshita M, Ono K, Horie T, Nagao K, Nishi H, Kuwabara Y, Takanabe-Mori R, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. Regulation of adipocyte differentiation by activation of serotonin (5-HT) receptors 5-HT_{2A}R and 5-HT_{2C}R and involvement of microRNA-448-mediated repression of KLF5. *Mol Endocrinol.* 2010;24(10):1978–87.
- Kirchner H, Sinha I, Gao H, Ruby MA, Schönke M, Lindvall JM, Barrès R, Krook A, Näslund E, Dahlman-Wright K, Zierath JR. Altered DNA methylation of glycolytic and lipogenic genes in liver from obese and type 2 diabetic patients. *Molecular Metabolism* 2016; 171-183.
- Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Front Immunol.* 2014;5:470.

- Koyuer Y.E. Obez, tip-2 diyabetli hastalarda insülin direnci ile Il-6,CRP ve fibrinojen ilişkisi. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biokimya ve Klinik Biokimya Laboratuvarı, İstanbul, Uzmanlık tezi. 2005;28-40.
- Küçükoğlu K. Histonların Asetilasyonu ve Histon Deasetilaz İnhibitörleri. Türkiye Klinikleri J Pharm Sci. 2013;2(2)
- Koçak A, Kutlu R, Çivi S, Kılınç İ. Obezitede insülin direnci ile leptin, interlökin-6, hs-CRP ve fibrinojen ilişkisi. Türk Biyokimya Dergisi 2014; 39(3):373–382.
- Kulkarni H, Kos MZ, Neary J, Dyer TD, Kent JW Jr, Goring HH, et al. Novel epigenetic determinants of type 2 diabetes in Mexican-American families. Hum Mol Genet. 2015; 24:5330– 44.
- Lacomino G, Russo P, Stillitano I, Lauria F, Marena P, Ahrens W, De Luca P, Siani A. Circulating microRNAs are deregulated in overweight/obese children: preliminary results of the I.Family study. Genes & Nutrition 2016; 11:23.
- Lacomino G and Siani A. Role of microRNAs in obesity and obesity related diseases. Genes & Nutrition 2017; 12:23.
- Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, Kim W, Kim MM, Srikantan S, Martindale JL, Hutchison ER, Kim HH, Marasa BS, et al. miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. Mol Cell Biol. 2011;31(4):626–38.
- Li G, Ning C, Ma Y, Jin L, Tang Q, Li X, Li M, Liu H: miR-26b promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through targeting PTEN. DNA Cell Biol 2017.
- Li M, Liu Z, Zhang Z, Liu G, Sun S, Sun C. miR-103 promotes 3T3-L1 cell adipogenesis through AKT/mTOR signal pathway with its target being MEF2D. Biol Chem. 2015;396(3):235–44.
- Li S, Zhu J, Zhang W, Chen Y, Zhang K, Popescu LM, Ma X, Lau WB, Rong R, Yu X, et al. Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. Circulation. 2011; 124(2):175–84.
- Ling C, Del Guerra S, Lupi R, Ronn T, Granhall C, Luthman H, et al. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. Diabetologia. 2008; 51:615–22.
- Ling HY, Wen GB, Feng SD, Tuo QH, Ou HS, Yao CH, Zhu BY, Gao ZP, Zhang L, Liao DF. MicroRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through modulation of extracellular signal-regulated kinase signalling. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2011;38(4):239–46.
- Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ. C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(22):12532–7.

- Lo KA, Huang S, Walet AC, Zhang Z, Leow MK, Liu M, and Sun L. Adipocyte long-noncoding rna transcriptome analysis of obese mice identified lnc-leptin, which regulates leptin. *Diabetes* 2018;67:1045–1056.
- Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 2015; 518, 197-206.
- Lopomo, E. Burgio, L. Migliore. Chapter Six-Epigenetics of Obesity. *Progress in Molecular Biology and Translational A. Science* . Elsevier 2016; 140:151-184.
- Lu XV, Nicholson JR, Akil H, Watson SJ. Time course of short-term and long-term orexigenic effects of Agouti-related protein. *Neuroreport*. 2001;8: 12(6): 1281-4.
- Ma Y, Liu D. Hydrodynamic delivery of adiponectin and adiponectin receptor 2 gene blocks high-fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Gene Ther* 2013; 20(8):846-852.
- Main AM, Gillberg L , Jacobsen AL , Nilsson E, Gjesing AP , Hansen T , Pedersen O , Ribel-Madsen R ve Vaag A. DNA methylation and gene expression of HIF3A: cross-tissue validation and associations with BMI and insulin resistance. *Clinical Epigenetics* 2016; 8:89.
- Mamtani M, Kulkarni H, Dyer TD, Goring HH, Neary JL, Cole SA, et al. Genome- and epigenome-wide association study of hypertriglyceridemic waist in Mexican American families. *Clinical epigenetics*. 2016; 8:6.
- Mansego ML, Garcia-Lacarte M, Milagro FI, Marti A, Marjinez JA. DNA methylation of miRNA coding sequences putatively associated with childhood obesity. *Pediatric Obesity* 2017; 12:19–27.
- Marchand L, Jalabert A, Meugnier E, Van den Hende K, Fabien N, Nicolino M, Madec AM, Thivolet C, Rome S. miRNA-375 a sensor of glucotoxicity is altered in the serum of children with newly diagnosed type 1 diabetes. *J Diabetes Res*. 2016;2016:1869082.
- Mendelson MM, Marioni RE, Joehanes R, Liu C, Hedman AK, Aslibekyan S, et al. Association of Body Mass Index with DNA Methylation and Gene Expression in Blood Cells and Relations to Cardiometabolic Disease: A Mendelian Randomization Approach. *PLOS medicine*. 2017; 14:1002215.
- McGregor RA, Choi MS. MicroRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. *Curr Mol Med*. 2011;11:304-16.
- Mirbase, 2018. hsa-mir-130b, hsa-mir-146b-5p.
<http://www.mirbase.org>, 2019.
- Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, Bernad A, Sanchez-Madrid F. Unidirectional transfer of

- microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 2011;2:282.
- Moseti D, Regassa A, Kim WK: Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):124.
- Mudry JM, Lassiter DG, Nylen C, Garcia-Calzon S, Naslund E, Krook A, et al. Insulin and Glucose Alter Death-Associated Protein Kinase 3 (DAPK3) DNA Methylation in Human Skeletal Muscle. *Diabetes.* 2017; 66:651–62.
- Muzzin P, Eisensmith RC, Copeland KC, Woo SL. Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(25):14804-14808.
- Na YK, Hong HS, Lee WK, Kim YH, ve Kim DS. Increased Methylation of Interleukin 6 Gene Is Associated with Obesity in Korean Women .*Mol. Cells* 2015; 38(5): 452-456.
- Narayanaswami V, Dwoskin LP. Obesity: Current and potential pharmacotherapeutics and targets. *Pharmacology & Therapeutics* 2017; 170, 116-147.
- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 2002;108(4):475-87.
- NCBI, IL6R interleukin 6 receptor *Homo sapiens* (human).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3570>, 2019.
- NCBI, HIF3A hypoxia inducible factor 3 subunit alpha *Homo sapiens* (human).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64344>, 2019.
- Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 2014; 76: 259-268.
- Neyzi O, Günöz H, Furman A, Bundak R, Gökçay G. ve Darendeliler F. Türk çocuklarında vücut ağırlığı, boy uzunluğu, baş çevresi ve vücut kitle indeksi referans değerleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2008; 51(1): 1-14.
- Nilsson E, Jansson PA, Perfiliev A, Volkov P, Pedersen M, Svensson MK, Poulsen P, Ribel-Madsen R, Pedersen NL, Almgren P, Fadsta J, Rönn T, Klarlund Pedersen B, Scheele C, Vaag A, Ling C. Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 2014;63:2962-76.
- Nott A, Watson PM, Robinson JD, Crepaldi L, Riccio A. S-Nitrosylation of histone deacetylase 2 induces chromatin remodelling in neurons. *Nature* 2008; 455(7211):411-415
- Ollmann MM, Lamoreux ML, Wilson BD, Barsh GS. Interaction of Agouti protein with the melanocortin I receptor in vitro and in vivo. *Genes Dev.* 1998;1:12(3):316-30.

- Ortega FJ, Mercader JM, Catalan V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M, Gomez-Ambrosi J, Anglada R, Fernandez-Formoso JA, Ricart W, et al. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem*. 2013; 59(5):781–92.
- Özkan B, Bereket A, Turan S, Keskin S. Addition of orlistat to conventional treatment in adolescents with severe obesity. *European Journal of Pediatrics* 2004;163(12):738-741.
- Park YS, David AE, Huang Y, Park JB, He H, Byun Y, Yang VC. In vivo delivery of cell-permeable antisense hypoxia-inducible factor 1alpha oligonucleotide to adipose tissue reduces adiposity in obese mice. *J Control Release* 2012;161(1):1-9.
- Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *J. Vis. Exp*. 2011; (56):170.
- Peng Y, Xiang H, Chen C, Zheng R, Chai J, Peng J, Jiang S. MiR-224 impairs adipocyte early differentiation and regulates fatty acid metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(8):1585–93.
- Pfeiffer S , Krüger J , Maierhofer A, Böttcher Y, Klötting N, Hajj NE, Schleinitz D, Schön MR, Dietrich A, Fasshauer M, Lohmann T, Dreßler M, Stumvoll M, Haaf T, Blüher M ve Kovacs P. Hypoxia-inducible factor 3A gene expression and methylation in adipose tissue is related to adipose tissue dysfunction. *Scientific Reports* . 2016; 6:27969.
- Pirola CJ, Gianotti TF, Burgueno AL, Rey-Funes M, Loidl CF, Mallardi P, et al. Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut*. 2013; 62:1356–63.
- Qin L, Chen Y, Niu Y, Chen W, Wang Q, Xiao S, Li A, Xie Y, Li J, Zhao X, et al. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/betacatenin signaling pathway. *BMC Genomics*. 2010;11:320.
- Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV. Obesity in C57BL/6Jmice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int. J. Obes*. 2008; 32: 451–463.
- Rutkowski JM, Stern JH, Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol* 2015;208:501-12.
- Romania P, Bracaglia G, Bertania A, Locatelli F. Epigenetic deregulation of micrornas in rhabdomyosarcoma and neuroblastoma and translational perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* 2012;13(12):16554-79.
- Ronn T, Volkov P, Gillberg L, Kokosar M, Perfilyev A, Jacobsen AL, et al. Impact of age, BMI and HbA1c levels on the genome-wide DNA methylation and mRNA expression patterns in human adipose tissue and identification of epigenetic biomarkers in blood. *Hum Mol Genet*. 2015; 24:3792–813.

- Rotllan N, Price N, Pati P, Goedeke L, Fernandez-Hernando C. microRNAs in lipoprotein metabolism and cardiometabolic disorders. *Atherosclerosis*. 2016;246:352–60.
- Sağlam F, Güven H. Obezitenin Cerrahi Tedavisi. *Okmeydanı Tıp Dergisi* 2014;30:60-65.
- Sağlık Bakanlığı, <https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/t45.pdf>, 2008.
- Saltiel AR. Insulin resistance in the defense against obesity. *Cell Metab*. 2012;15: 798-804.
- Samson SL, Gonzalez EV, Yechoor V, Bajaj M, Oka K, Chan L. Gene therapy for diabetes: metabolic effects of helper-dependent adenoviral exendin 4 expression in a diet-induced obesity mouse model. *Mol Ther* 2008;16(11):1805-1812.
- Sandalcı U. Türkiye’de Obezite Vergisinin Kabul Edilebilirliğine İlişkin Bir Alan Araştırması. Dumlupınar Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Maliye Anabilim Dalı, Kütahya, Doktora Tezi, 2018; 25-55.
- Sdralis E, Argentou M, Mead N, Kehagias I, Alexandridis T, Kalfarentzos F. A prospective randomized study comparing patients with morbid obesity submitted to sleeve gastrectomy with or without omentectomy. *Obes Surg*. 2013;23:965-71.
- Sell H, Eckel J. Monocyte chemotactic protein-1 and its role in insulinresistance. *Curr. Opin. Lipidol*. 2007;18:258–262.
- Sharma NKVV, Ma L, Hasstedt SJ, Das SK. Obesity associated modulation of mirna and co-regulated target transcripts in human adipose tissue of non-diabetic subjects. *Microrna* 2015;4:194–204.
- Shi C, Zhu L, Chen X, Gu N, Chen L. IL-6 and TNF-a induced obesity-related inflammatory response through transcriptional regulation of miR-146b. *J. Interferon Cytokine Res*. 2014;34:342–348.
- Shi C, Zhang M, Tong M, Yang L, Pang L, Chen L, Xu G, Chi X, Hong Q, Ni Y, et al. miR-148a is associated with obesity and modulates adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells through Wnt signaling. *Sci Rep*. 2015;5:9930.
- Shi XE, Li YF, Jia L, Ji HL, Song ZY, Cheng J, Wu GF, Song CC, Zhang QL, Zhu JY, et al. MicroRNA-199a-5p affects porcine preadipocyte proliferation and differentiation. *Int J Mol Sci*. 2014;15(5):8526–38.
- Shin MK, Drager LF, Yao Q, Bevans-Fonti S, Yoo DY, Jun JC, Aja S, Bhanot S, Polotsky VY. Metabolic consequences of high-fat diet are attenuated by suppression of HIF-1alpha. *PLoS One* 2012;(10):46562.
- Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Luthy R, Stark KL. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev*. 1997;11(5):593-602.

- Sırıken B, Sırıken F, Ünsal C, Çiftci C. Beslenme ve Epigenetik. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2018;12-18.
- Skarn M, Namlos HM, Noordhuis P, Wang MY, Meza-Zepeda LA, Myklebost O. Adipocyte differentiation of human bone marrow-derived stromal cells is modulated by microRNA-155, microRNA-221, and microRNA-222. *Stem Cells Dev.* 2012;21(6):873–83.
- Small CJ, Liu YL, Stanley SA, Connoley IP, Kennedy A, Stock MJ, Bloom SR. Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003; 27(4):530-3.
- Sözen MA. Obezite ve Obezitenin Genetigi, *The Medical Journal of Kocatepe.* 2006;7: 1-2.
- Stefan N, Vozarova B, Del Parigi A, Ossowski V, Thompson DB, Hanson RL, Ravussin E, Tataranni PA. The Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor in Pima Indians: influence on energy expenditure, physical activity and lipid metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(12): 1629-32.
- Sun L, Xie H, Mori MA, Alexander R, Yuan B, Hattangadi SM, Liu Q, Kahn CR, Lodish HF. Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nat Cell Biol.* 2011;13(8):958–65.
- Sun T, Fu M, Bookout AL, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol.* 2009;23(6):925–31.
- Summers LK, Samra JS, Humphreys SM, Morris RJ, Frayn KN. Subcutaneous abdominal adipose tissue blood flow: variation within and between subjects and relationship to obesity. *Clin Sci* 1996;91:679-683.
- Tang YF, Zhang Y, Li XY, Li C, Tian W, Liu L. Expression of miR-31, miR-125b-5p, and miR-326 in the adipogenic differentiation process of adipose-derived stem cells. *OMICS.* 2009;13(4):331–6.
- Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:715–36.
- Taniguchi M, Nakajima I, Chikuni K, Kojima M, Awata T, Mikawa S. MicroRNA33b downregulates the differentiation and development of porcine preadipocytes. *Mol Biol Rep.* 2014;41(2):1081–90.
- Thompson MD, Cismowski MJ, Serpico M, Pusateri A, Brigstock DR: Elevation of circulating microRNA levels in obese children compared to healthy controls. *Clin Obes* 2017
- Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition* 2004;92(3):347-355.
- Trayhurn P, Wan, B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br. J. Nutr.* 2008;100:227–235.

- Tritos NA, Mantzoros CS. Leptin: its role in obesity and beyond. *Diabetologia*. 1997;40(12):1371-9.
- Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(16):7223–33.
- Urhan M, Akbulut G. Obezite ve Kanser İlişkisi: Leptin Kanserojen bir Adipokin midir? İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi 2017;2(3):35-43.
- Usanma Koban B, Vural Tuzcular Z, Gönenç I, Işıtmangil G. Beslenme, diğer çevresel faktörler ve mikrobiyotanın obezite epigenetiğine etkileri. *Jour Turk Fam Phy* 2017;08(3):108-117.
- Van DSJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhausler BS. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes* 2015; 39, 85–97.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011;13(4):423–33.
- Volkov P, Bacos K, Ofori JK, Esguerra JLS, Eliasson L, Ronn T, et al. Whole-Genome Bisulfite Sequencing of Human Pancreatic Islets Reveals Novel Differentially Methylated Regions in Type 2 Diabetes Pathogenesis. *Diabetes*. 2017; 66:1074–85.
- Wahl S, Drong A, Lehne B, Loh M, Scott WR, Kunze S, et al. Epigenome-wide association study of body mass index, and the adverse outcomes of adiposity. *Nature*. 2017; 541:81–6.
- Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(20):7248-59.
- Wang Q, Li YC, Wang J, Kong J, Qi Y, Quigg RJ, Li X. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8):2889–94.
- Wang, S., Song, J., Yang, Y., Zhang, Y., Wang, H., Ma, J. HIF3A DNA Methylation Is Associated with Childhood Obesity and ALT. *PLoS ONE* 2015;10(12).
- Wang S, Song J , Yang Y, Zhang Y, Chawla NV, Ma J ve Wang H . Interaction between obesity and the Hypoxia Inducible Factor 3 Alpha Subunit rs3826795 polymorphism in relation with plasma alanine aminotransferase. *BMC Medical Genetics* 2017; 18:80.
- Wang YC, Li Y, Wang XY, Zhang D, Zhang H, Wu Q, He YQ, Wang JY, Zhang L, Xia H. Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight/obesity. *Diabetologia*. 2013;56(10):2275–85.
- Wang YT, Tsai PC, Liao YC, Hsu CY, Juo SH. Circulating microRNAs have a sex-specific association with metabolic syndrome. *J Biomed Sci*. 2013;20:72.

- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11): 1733–41.
- Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1111–9.
- Wheatley KE, Nogueira LM., Perkins SN, Hursting, SD. Differential effects of calorie restriction and exercise on the adipose transcriptome in diet-induced obese mice. *J. Obes*. 2011;1-13.
- Wilcox DM, Yang R, Morgan SJ, Nguyen PT, Voorbach MJ, Jung PM, Haasch DL, Lin E, Bush EN, Ongenorth TJ, Jacobson PB, Collins CA, Rondinone CM, Surowy T, Landschulz KT. Delivery of RNAi reagents in murine models of obesity and diabetes. *J RNAi Gene Silencing* 2006;3(1):225-236.
- Willeit P, Skrobilin P, Moschen AR, Yin X, Kaudewitz D, Zampetaki A, Barwari T, Whitehead M, Ramirez CM, Goedeke L, et al. Circulating MicroRNA-122 is associated with the risk of new-onset metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2017;66(2):347–57.
- WHO. Obesity Fact Sheet N311.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>, 2015.
- Wilsey J, Zolotukhin S, Prima V, Scarpace PJ. Central leptin gene therapy fails to overcome leptin resistance associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 285(5):1011- 1020.
- Wilson LE, Harlid S, Xu Z, Sandler DP, Taylor JA. An epigenome-wide study of body mass index and DNA methylation in blood using participants from the Sister Study cohort. *Int J Obes (Lond)*. 2017; 41:194–9.
- Wisse, B. E. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:2792-2800.
- Yang Y, Fu W, Chen J, Olashaw N, Zhang X, Nicosia SV, et al. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 2007; 9(11): 1253-1262.
- Yang Z, Bian C, Zhou H, Huang S, Wang S, Liao L, Zhao RC. MicroRNA hsamiR-138 inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through adenovirus EID-1. *Stem Cells Dev*. 2011; 20(2):259–67.
- Yanovski JA. Aggressive treatment for childhood and adolescent obesity. *Nestle Nutrition Workshop Series Pediatric Program* 2001; (49): 41-43.
- Ye J, McGuinness OP. Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;304(5):466-77.
- Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation. *Cell* 153(4):747-758, 2013.

- Yi SV, Goodisman MA. Computational approaches for understanding the evolution of DNA methylation in animals. *Epigenetics*. 2009;4(8):551-6.
- Yu L, Tai L, Zhang L, Chu Y, Li Y and Zhou L. Comparative analyses of long non-coding RNA in lean and obese pigs. *Oncotarget* 2017;8(25): 41440-41450.
- Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010;107(6):810–7.
- Zakharova I, Klimov L, Kuryaninova V , Nikitina I , Malyavskaya S , Dolbnya S , Kasyanova A, Atanesyan R , Stoyan M , Todieva A , Kostrova G ve Lebedev A. Vitamin D Insufficiency in Overweight and Obese Children and Adolescents. *Frontiers in Endocrinology* 2019;10:103.
- Zaragosi LE, Wdziekonski B, Brigand KL, Villageois P, Mari B, Waldmann R, Dani C, Barbry P. Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. *Genome Biol*. 2011;12(7):64.
- Zhang JF, Fu WM, He ML, Wang H, Wang WM, Yu SC, Bian XW, Zhou J, Lin MC, Lu G, et al. MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix. *Mol Biol Cell*. 2011;22(21):3955–61.
- Zhang, M. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2007; 19: 266-272.
- Zheng LD, Linarelli LE, Liu L, Wall SS, Greenawald MH, Seidel RW, et al. Insulin resistance is associated with epigenetic and genetic regulation of mitochondrial DNA in obese humans. *Clinical epigenetics*. 2015; 7:60.
- Zheng S, Li Q, Zhang, Y, Balluff Z, Pan Y. Histone deacetylase 3 (HDAC3) participates in the transcriptional repression of the p16 INK4a gene in mammary gland of the female rat offspring exposed to an early-life high-fat diet. *Epigenetics*, 2011;(7)183–190.
- Zhu J, Yao X. Use of DNA methylation for cancer detection: promises and challenges. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2009; 41(1):147-154.
- Zhu JG, Xia L, Ji CB, Zhang CM, Zhu GZ, Shi CM, Chen L, Qin DN, Guo XR,. Differential DNA methylation status between human preadipocytes and mature adipocytes. *Cell Biochem. Biophys*. 2012; 63:1-15.
- Zile MR, Mehurg SM, Arroyo JE, Stroud RE, DeSantis SM, Spinale FG. Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4(6):614–9.
- Zobel DP, Andreasen CH, Burgdorf KS, Andersson EA, Sandbaek A. Variation in the gene encoding Kruppel-like factor 7 influences body fat: studies of 14818 Danes. *Eur. J. Endocrinol*. 2009;160:603–609.

EKLER

Ek-1. Etik Kuruk Raporu



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/456-547

15.11.2016

Sayın Prof. Dr. Nurten KARA

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Çocukluk çağı obezitesinde potansiyel biyomarker olabilecek genetik ve epigenetik değişikliklerin incelenmesi** başlıklı OMÜ KAEK 2016/301 Karar nolu Genetik çalışma nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 29.09.2016 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.


Prof. Dr. Dursun AYGÜN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Ek-2. Hasta Bilgi Formu

Tarih:

HASTA BİLGİ FORMU

DOSYA NO:

AD-SOYAD:

DOĞUM TARİHİ:

DOĞUM YERİ:

CİNSİYET: KIZ [] ☐ ERKEK [] ☐

TANI:

YAŞADIĞI YER:

KARDEŞ SAYISI:

ANNE BOYU:

ANNE VÜCUT AĞIRLIĞI:

BABA BOYU:

BABA VÜCUT AĞIRLIĞI:

Klinik ve Laboratuvar Özellikleri	
Boy (cm)	
Vücut Ağırlığı (kg)	
Bel Çevresi (cm)	
Karın Çevresi(cm)	
VKİ(kg/m ²)	
HDL Kolesterol (mg/dL)	
LDL Kolesterol (mg/dL)	
Trigliserid (mg/dL)	
Total Kolesterol (mg/dL)	
İnsulin (uIU/mL)	
Glukoz (mg/dL)	
HOMA-IR	
AST	
ALT	

Ek-3. Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (BGOF)

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

ARAŞTIRMANIN ADI:

Çocukluk Çağı Obezitesinde Potansiyel Biyomarker Olabilecek Epigenetik Değişikliklerin İncelenmesi

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar vererseniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar vererseniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Ayrıca destekleyici firma çalışmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

Obezite vücuda besinler yoluyla alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması neticesinde ortaya çıkan yağlı vücut kitlesinin yağsız vücut kitlesine oranla artması ile karakterize kronik bir hastalıktır. Obezite görülme sıklığı giderek artan ve ölümle sonuçlanabilecek birçok metabolik hastalığın temelini oluşturmaktadır. Yaklaşık 43 milyon okul öncesi çocuğun yüksek kilolu yada obez olduğu bilinmektedir. 1990 yılından 2010 yılına kadar bu sayı %60 artış göstermiştir. Obez çocuklar ileriki yaşamlarında; ateroskleroz, tip2 diyabet, hipertansiyon, ve kanser gibi ölümcül hastalıklara yakalanmak için yüksek risk taşımaktadırlar. Besin alınımları, enerji

Ek-3

harcanması, yağ metabolizmasındaki ilgili genlerin mutasyonu, varvasyonu ve epigenetik değişimlerinin obezite ile ilgili olduğu gözlenmiştir Çalışma amacımız obezite gelişimine neden olabilecek genetik ve epigenetik faktörleri araştırmaktır.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Çalışma için 2ml damardan alınan tam kan örneği kullanılacaktır.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışma için damardan bir kez alacağımız kan örneğini vermeniz yeterli olacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Çalışmaya katılmanız durumunda size uygulanacak olan işlemin size herhangi bir yan etkisi, ağrı oluşturmaması ve sağlığınıza herhangi bir zararı bulunmamaktadır.

GEBELİK VE DOĞUM KONTROLÜ

Eğer denek / hasta doğurganlık döneminde / emziren bir kadın ise.....

Eğer hasta gebe ise çalışmaya katılamaz çünkü vücut kitle indeksi değerleri yanıltıcı olabilir.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR? (Varsa açıklayınız)

Nedenlerinin , risk faktörlerinin iyi bir şekilde bilinmesi obezitenin engellenmesi ve tedavi seçeneklerinin artırılması bakımından önemlidir. Çalışmamız; gönüllü katılımıyla, bu nedenleri ortaya çıkarmaya katkı sağlayacaktır.

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğimin veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabilirim bilincindeyim.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Araştırmaya katılmanız nedeniyle size para ödenmeyecek yada sizden para talep edilmeyecektir.

Çalışma doktoru ziyaretleri ve çalışmayla ilgili olan tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyicisi tarafından karşılanacak. Size, bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir. Ayrıca çalışmaya bağlı makul miktardaki yol gideriniz makbuzları gösterildiği takdirde karşılanacaktır.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Çalışmanın yürütülmesi ve yayınlanması aşaması dâhil, hiçbir aşamada sizin isminiz ve kişisel bilgileriniz kullanılmayacaktır.

Çalışma destekleyicisi firma çalışma verilerinizi, sadece yukarıda belirtilen amaçlarda kullanacak olan kendi grubundaki diğer şirketler, hizmet alınan kurumlar, anlaşmalı firmalar ve diğer araştırma kuruluşları ile paylaşabilir. Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, çalışma verilerinizi artık kullanılmayacak ya da diğer kişilerle paylaşılmayacaktır. Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Esra TEKCAN

Tel: 05321720078

Ek-3

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:

Bulunmamaktadır.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekiyorsa Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekiyorsa Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Ek-4. Çocuk Olur Formu

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN ÇOCUK OLUR FORMU

Sevgili Küçüğüm,

Ben *Obez çocuklarda bir araştırma yapıyoruz. Amacımız bu çocuklarda obezite ile ilişkili genetik ve epigenetik değişiklikleri incelemek.* Araştırma ile yeni bilgiler öğreneceğiz. Bu araştırmaya katılmanı diliyoruz.

Araştırmayı ben, ... ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. *Bu araştırmaya katılacak olursan senden kan alacağız. Kan alınırken canın biraz acıyabilir ama çabuk geçecektir.*

Bu araştırmanın sonuçları senin gibi çocuklar için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz, sonuçları bildireceğiz ama senin adın bizde gizli kalacak.

Araştırmaya katılıp katılmamak için karar vermeden önce anne ve baban ile konuşup onlara danışmanı öneriyoruz. Onlara da bu araştırmadan bahsedip onaylarını/izinlerini alacağız. Anne ve baban kabul etseler bile sen kabul etmeyebilirsin. Bu araştırmaya katılmak senin isteğine bağlı ve istemezsen katılmayabilirsin. Bu nedenle hiç kimse sana kızmaz ya da küsmez. Önce katılmayı kabul etsen bile sonradan vazgeçebilirsin, bu tamamen sana bağlı. Kabul etmediğin durumda da doktorlar muayene ve diğer işlemlerde sana önceden olduğu gibi iyi davranacaktır.

Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğin zaman bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim bu kağıtta yazıyor. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan aşağıya lütfen adını ve soyadını yaz ve imzanı at. İmzaladıktan sonra sana ve ailene bu formun bir kopyası verilecektir.

Çocuğun adı, soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı, soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştıracının adı, soyadı, ünvanı:

Adres :

Tel:

İmza:

Tarih:

Ek-5. Tabakalandırılmış Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

TABAKALANDIRILMIŞ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

A. Örneklerin gelecekteki kullanımı: *Lütfen işaretleyiniz.*

- ☐ İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ Sadece bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum (*Bu kutuyu seçmem durumunda, bu çalışmaya katılmayacağımı anlıyorum*).

B. Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (*kimlik bilgileriniz*) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

- ☐ Tarafımdan alınmış kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.
- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı tüm çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.
- ☐ Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

**Kodlanmış örnek:* Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı: Esra Tekcan

Doğum Yeri: Fatsa/Ordu

Doğum Tarihi: 24.01.1982

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji bölümü-2006

Yüksek Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı-2011

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl:

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji Laboratuvarı, Merkez Biyokimya Flow Sitometri Laboratuvarı 2006-Devam ediyor (Biyolog)

E-Posta: esrabkr@hotmail.com