



Rat Karaciğerinde Lipogenez Yolağındaki FAS, ACC, SCD-1, ChREBP, SREBP-1c, LXR α ve İnflamasyon Yolağındaki TNF α , IL-1 β , IL-6 Genlerinin Fruktöze Bağlı Olarak Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Program Kodu: 3001

Proje No: 118O381

Proje Yürütücüsü:
Dr. Öğretim Üyesi Hüseyin ÖZKAN

Araştırmacı(lar):

Prof. Dr. Şule Yurdağül ÖZSOY

Dr. Öğretim Üyesi Tuncer KUTLU

ŞUBAT 2020
HATAY

ÖNSÖZ

Sağlıklı yaşam ile ilgili bilinç her geçen gün artmaktadır. Teknolojinin gelişmesi ve sağlık bilimleri ile ilgili alanlarda yapılan yoğun çalışmalar organizmadaki fizyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasında önemli ilerlemeler sağlamıştır. Metabolik aktivite üzerine moleküler düzeyde yapılan araştırmalarla önemli çıktılar üretilmeye devam edilmektedir.

Son 20 yılda, sağlıklı yaşamın sürdürülebilirliğinde önemli rol üstlenen beslenme fizyolojisi ile ilgili yapılan araştırmalarda önemli enerji kaynaklarından olan karbonhidrat, protein ve lipidlerin diyetteki oranları üzerine odaklanılmıştır.

Başlarda metabolik bozukluklardan diyetteki lipidlerin sorumlu olduğu düşünülürken yakın zamandan beri yapılan araştırmalarda bu bozuklukların oluşmasında lipidlerden ziyade karbonhidratların sorumlu olabileceğine dair bulgular elde edilmiştir. Özellikle diyet kullanımı her geçen gün artan fruktoz üzerine tartışmalar devam etmektedir.

Fruktoz, bir disakkarit olan sükrozun yapısında da bulunan, basit bir şekerdir. Meyve şekeri olarak bilinen fruktozun en önemli kaynakları meyve ve balın yanı sıra özellikle YFMŞ (Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu)'dir. Paketlenmiş gıdaların birçoğunda enerji kaynağı olmasının yanı sıra tatlandırıcı amacıyla kullanılmaktadır. Sükroza göre daha ucuz ve yaklaşık 2 kat tatlı olan bu şeker organizmada diğer şekerlere göre farklı şekilde metabolize edilmektedir. Tüketimi her geçen gün yaygınlaşan bu şekerin metabolik bozukluklara sebep olduğu ile ilgili önemli çalışmalar bulunmaktadır.

Yapılan keşifler ve gelişen teknoloji sayesinde organizmadaki fizyolojik aktivitenin moleküler düzeyde araştırılabilmesi mümkün hale gelmiştir. Bu sayede metabolizmada meydana gelen olaylar mRNA ekspresyonu ve protein aktivitesi düzeylerinde incelenebilir olmuştur.

Bu proje, farklı dozlarda fruktozla beslenmenin metabolik yollar üzerine olan etkilerini moleküler ve biyokimyasal düzeyde araştırılması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla çalışma, önemli deney hayvanlarından olan ve metabolizma ile ilgili çalışmalarda yaygın kullanım alanı bulan ratlarda yapılmıştır. Benzer yaş ve ağırlıktaki ratlar, farklı konsantrasyonlardaki fruktoz çözeltileriyle 10 hafta boyunca beslenmiş, besleme periyodu sonunda bazı biyokimyasal parametreler ve karaciğer dokusundaki moleküler aktivite mRNA düzeyinde incelenmiştir. Bununla birlikte karaciğer dokularındaki histopatolojik değişiklikler araştırılmıştır. Proje sayesinde farklı konsantrasyonlardaki fruktoz çözeltileriyle 10 hafta beslenen ratlarda biyokimyasal değişimler ve özellikle karaciğer fizyolojisi hakkında önemli çıktılar elde edilmiştir.

“Rat Karaciğerinde Lipogenez Yolağındaki FAS, ACC, SCD-1, ChREBP, SREBP-1c, LXRα ve İnflamasyon Yolağındaki TNFα, IL-1β, IL-6 Genlerinin Fruktoza Bağlı Olarak Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi” başlıklı ve 118O381 numaralı bu çalışma 3001-



Başlangıç AR-GE projeleri kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje önerisi 30.03.2018 tarihinde sunulan projenin başlangıç tarihi 15.08.2018'dir. Proje planlandığı şekliyle başarılı bir şekilde sürdürülmüş ve tamamlanmıştır. Projenin yürütülmesine mali destek sağlayan TÜBİTAK Tarım Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu Sekreterliği'ne (Proje no: 118O381) teşekkür ederiz.

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	III
TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ	IV
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ	1
2. Literatür Özeti	3
2.1. Beslenme, Diyet ve Enerji Metabolizması	3
2.2. Çalışmada Aktivitesi Araştırılan Genler	6
2.2.1. FAS	6
2.2.2. ACC	6
2.2.3. SCD-1	6
2.2.4. ChREBP	7
2.2.5. SREBP-1c	7
2.2.6. LXR α	8
2.2.7. TNF α	8
2.2.8. IL-1 β	9
2.2.9. IL-6	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
3.1. Hayvan Materyali, Grupların Oluşturulması ve Besleme Periyodu	10
3.2. Ötenazi ile Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması	11
3.3. Plazma analizleri	12
3.4. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	12
3.5. Real Time PCR (RT-qPCR) ile Gen Ekspresyonu Analizi	12
3.6. Histopatolojik İncelemeler	13
3.7. İstatistiksel analiz	14
4. BULGULAR	15
4.1. Haftalık Temel Rasyon, Su/Çözeltili Tüketimleri ve Vücut Ağırlığı Değişimleri	15
4.2. Karaciğer ağırlıkları ve Plazma Analizi Bulguları	17
4.3. RNA İzolasyonu ve Gen Ekspresyonu Bulguları	17
4.4. Histopatolojik Bulgular	26
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ	37
7. KAYNAKLAR	38

TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Sayfa

Tablo 1. Gruplardaki rasyon ve su/çözelti içerikleri	10
Tablo 2. Temel rasyon içeriği	11
Tablo 3. Amplifikasyonu Yapılan Genlerin Forward ve Reverse Primer Dizileri	13
Tablo 4. Gruplardaki haftalık vücut ağırlığı ortalamaları ile yem ve su/çözelti tüketim miktarları	16
Tablo 5. Gruplardaki hayvanların karaciğer ağırlıkları ile bazı biyokimyasal parametreler	17
Tablo 6. Gruplarda karaciğer dokularında hedef genlere ait mRNA kat değişimleri	26
Tablo 7. Karaciğerde gözlenen histopatolojik bulgular	31
Şekil 1. Gruplardaki örneklerin 28S ve 18S rRNA ünitelerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri	18
Şekil 2. PPIA erime eğrisi grafiği	18
Şekil 3. FAS erime eğrisi grafiği	19
Şekil 4. ACC erime eğrisi grafiği	19
Şekil 5. SCD-1 erime eğrisi grafiği	19
Şekil 6. ChREBP erime eğrisi grafiği	20
Şekil 7. SREBP-1c erime eğrisi grafiği	20
Şekil 8. LXR α erime eğrisi grafiği	20
Şekil 9. TNF α erime eğrisi grafiği	21
Şekil 10. IL-1 β erime eğrisi grafiği	21
Şekil 11. IL-6 erime eğrisi grafiği	21
Şekil 12. PPIA Ct grafiği	22
Şekil 13. FAS Ct grafiği	22
Şekil 14. ACC Ct grafiği	22
Şekil 15. SCD-1 Ct grafiği	23
Şekil 16. ChREBP Ct grafiği	23
Şekil 17. SREBP-1c Ct grafiği	23
Şekil 18. LXR α Ct grafiği	24
Şekil 19. TNF α Ct grafiği	24
Şekil 20. IL-1 β Ct grafiği	24
Şekil 21. IL-6 Ct grafiği	25
Şekil 22. Kontrol grubunda karaciğerde normal histolojik yapı	27
Şekil 23. F15 grubunda karaciğerde normal histolojik yapı	27
Şekil 24. F15 grubunda karaciğerde normal histolojik yapı	28
Şekil 25. F30 grubunda hepatositlerde yağ vakuelleri ve hidropik dejenerasyon	28

Şekil 26. F30 grubunda karaciğer dokusunda sinüzoidlerde eritrositler ve perivasküler yangısal hücre infiltrasyonu	29
Şekil 27. F60 grubunda karaciğerde sinüzoidal boşluklarda eritrosit birikimi ile genişleme, yağlanma ve hidropik dejenerasyon	29
Şekil 28. F60 grubunda karaciğerde perivasküler yangısal hücre infiltrasyonu	30
Şekil 29. F60 grubunda hepatositlerde balonumsu dejenerasyon	30
Şekil 30. F60 grubunda karaciğerde geniş nekroz odakları	31

ÖZET

Rat Karaciğerinde Lipogenez Yolağındaki FAS, ACC, SCD-1, ChREBP, SREBP-1c, LXR α ve İnflamasyon Yolağındaki TNF α , IL-1 β , IL-6 Genlerinin Fruktoza Bağlı Olarak Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Bu çalışma farklı konsantrasyonlarda (%15, %30 ve %60) fruktoz içeren çözeltilerle beslenen ratlarda karaciğerde lipogenez ve inflamasyon yolağındaki genlerin ekspresyon seviyelerini belirlemek ve bazı biyokimyasal parametrelerle histopatolojik değişiklikleri araştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmada 32 Wistar albino erkek rat kullanılmıştır.

Çalışmada K (Kontrol, normal diyet), F15 (Normal diyet+%15'lik fruktoz çözeltisi), F30 (Normal diyet+ %30'luk fruktoz çözeltisi) ve F60 (Normal diyet+%60'lık fruktoz çözeltisi) olmak üzere 4 farklı grup oluşturulmuştur (n=8). On haftalık besleme periyodu sonrası anestezi altında kalpten kan alımı ile ötenazi uygulanan ratlardan karaciğer dokuları alınarak moleküler (-80 °C'de) ve histopatolojik analizler (% 10'luk tamponlu formol) için muhafaza edilmiştir. Alınan kanlardan plazma elde edilerek glikoz, insülin, HDL, LDL, total kolesterol ve trigliserit parametreleri belirlenmiştir. Karaciğer dokularından ise RT-qPCR teknolojisi ile FAS, ACC, SCD-1, ChREBP, SREBP-1c, LXR α , TNF α , IL-1 β ve IL-6 genlerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Ayrıca fruktoz tüketimine bağlı olarak karaciğerde şekillenen değişiklikler histopatolojik olarak incelenmiştir. Besleme periyodu sonrası vücut ağırlığı ortalamaları bakımından F30'un en ağır, F60'ın ise en hafif grup olduğu belirlenmiştir. Deneme gruplarının tamamında (F15, F30 ve F60) plazma trigliserit seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (P<0,05). F30 ve F60'da TNF α , IL-1 β ve IL-6 upregüle olurken (P<0,05), SREBP-1c, ChREBP, FAS, ACC ve SCD-1'in tüm deneme gruplarında upregüle olduğu tespit edilmiştir (P<0,05). Ayrıca, F30 ve F60 gruplarındaki ratların karaciğer dokularında dejeneratif değişiklikler ve steatoz olduğu belirlenmiştir. Fruktoza bağlı en fazla hasar F60 grubunda tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu fruktoz çözeltisinin tüketimi ile karaciğerde lipogenik ve inflamatuvar etkinliğe bağlı olarak önemli histopatolojik değişikliklerin olduğu görülmüştür.

Elde edilen bulgular, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması vücut ağırlığında önemli bir değişiklik olmadan fruktoz tüketimiyle gelişebileceğini göstermiştir. Çözelti şeklinde tüketilen fruktozun konsantrasyonunun, normal karaciğer fizyolojisi ve vücut homeostazisinin sürdürülebilmesinde çok önemli bir faktör olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca yapılan bu projeden elde edilen bulgular, diyetle yüksek dozlarda fruktoz kullanımıyla metabolik sendrom modeli oluşturabilmenin mümkün olduğunu göstermiştir.

ABSTRACT

Determination of Genes Expression Levels of FAS, ACC, SCD-1, ChREBP, SREBP-1c, LXR α in Lipogenesis Pathway and TNF α , IL-1 β , IL-6 in Inflammation Pathway Depending of Fructose in Rat Liver

This study was conducted to determine the expression levels of genes in the liver lipogenesis and inflammation pathways and to investigate histopathological changes with some biochemical parameters in rats fed with fructose-containing solutions at different concentrations (15%, 30% and 60%). 32 wistar albino male rats were used in the study.

In the study, 4 different groups were formed as K (Control, normal diet), F15 (Normal diet + 15% fructose solution), F30 (Normal diet + 30% fructose solution) and F60 (Normal diet + 60% fructose solution), (n = 8). After ten weeks feeding period, rats were euthanized with blood collection from the heart under anesthesia and liver tissues were taken and kept at for molecular (at -80 °C) and histopathological (in 10% formalin) analysis. Plasma was obtained from the blood samples and plasma glucose, insulin, HDL, LDL, total cholesterol and triglyceride parameters were determined. Expression levels of FAS, ACC, SCD-1, ChREBP, SREBP-1c, LXR α , TNF α , IL-1 β and IL-6 genes from liver tissues were investigated by RT-qPCR technology. In addition, changes shaped in the liver due to fructose consumption were examined histopathologically. After the feeding period, It was determined that F30 was the heaviest and F60 was the lightest group in terms of body weight averages. Plasma triglyceride level was found to be significantly higher in all experiment groups (F15, F30 and F60) compared to the control group (P<0.05). In F30 and F60; TNF α , IL-1 β and IL-6 were upregulated (P<0.05), while SREBP-1c, ChREBP, FAS, ACACA and SCD-1 were found to be upregulated in all experimental groups (P<0.05). In addition, the liver of the rats in the F30 and F60 groups had degenerative changes and steatosis. The most damage to fructose was detected in the F60 group. Beside lipogenic and inflammatory effect, it has been observed that there are important histopathological changes in the liver due to the consumption of high-concentration fructose solution.

The results show that non-alcoholic fatty liver can develop with fructose consumption without a significant change in body weight. It has been understood that the concentration of fructose consumed in solution is a very important factor in maintaining normal liver physiology and body homeostasis. In addition, with this study it was understood that it is possible to create a metabolic syndrome model by using high doses of fructose in the rats diet.

1. GİRİŞ

Enerji metabolizmasının regülasyonu çok sayıda karmaşık mekanizmanın kontrolündedir. Obezite ve diyabet, enerji metabolizmasındaki bozukluklara bağlı olarak şekillenmekte ve çağımızın en önde gelen epidemik sorunları olarak değerlendirilmektedir. Bu hastalıklar kanser ve kardiyovasküler bozuklukları da tetikledikleri için, günümüzde sağlık alanında yüksek maliyetlere sebep olan global bir sorun haline gelmiştir. Risk altındaki yetişkin popülasyonun yanı sıra, genç popülasyon da söz konusu durumdan etkilenmektedir (Ode vd., 2009). Yaşam şeklindeki değişiklikler, batı tarzı diyet ve bağırsak mikrobiyomu gibi faktörler bu hastalıkların şekillenmesinde önemli rol oynamaktadır (Softic vd., 2016).

Enerji metabolizması üzerine yapılan çalışmalarda diyetle bulunan basit şekerlerin özellikle de fruktozun metabolik hastalıkların şekillenmesinde önemli risk faktörü olduğu bildirilmektedir (Geidl-Flueck ve Gerber 2017, Sangesa vd., 2019). Fruktozun en önemli kaynağı mısır nişastasının hidroliziyle elde edilen ve alkolsüz içeceklerle paketlenmiş birçok gıdada kullanılan YFMŞ'dir (Özkan ve Yakan, 2019).

Meyve şekeri olarak bilinen fruktoz, organizmada sükroz ve glikozdan farklı olarak insülininden bağımsız olarak metabolize edilmekte ve lipogenez tetiklenmektedir (Ozkan ve Yakan, 2019). Fruktozun kronik olarak tüketimi sonucu karaciğer gibi metabolik aktivitenin yoğun olduğu dokularda inflamasyon gelişebileceği bildirilmektedir (Stanhope ve Havel, 2008; Lozano 2016). Fruktozun organizmaya olan etkileriyle ilgili yapılan çalışmalar ve tartışmalar devam etmektedir. Bununla birlikte tüketilen miktar, tüketim süresi ve olası zararlarıyla ilgili çalışmalar sınırlıdır.

Besin maddelerinin vücuttaki etkileriyle ilgili yapılan araştırmalar, sürdürülebilir sağlıklı yaşam için önem taşımaktadır. Daha az hareket etme gibi yaşam tarzında meydana gelen değişikliklerin yanı sıra beslenme şeklindeki değişiklikler metabolik bozuklukların görülme sıklığını artırmaktadır. Değişen oranlarda tüketime sunulan fruktozun organizmadaki moleküler ve biyokimyasal düzeydeki etkilerinin araştırılması önemlidir.

Çalışmada Wistar albino ırkı rat kullanılmıştır. Normal rasyona ilaveten %15, %30 ve %60 konsantrasyonlarda hazırlanan fruktoz çözeltileri *ad libitum* olarak tüketime sunulurak 10 haftalık besleme periyodu oluşturulmuştur. Çalışma başlangıcında benzer vücut ağırlıklarına sahip olan ratların deneme sonunda vücut ağırlıkları, plazmadaki bazı biyokimyasal parametreler, karaciğerde lipogenez ve inflamasyonla ilişkili genler mRNA düzeyinde incelenmiştir. Ayrıca farklı konsantrasyonlarda fruktoz tüketen ratların karaciğer histopatolojileri araştırılmış ve karaciğerde meydana gelen değişiklikler incelenmiştir.

Gen ekspresyonu uygulaması lipogenezde görevli FAS, ACC, SCD-1, ChREBP, SREBP-1c, LXR α ile inflamasyonda öncü rol alan TNF α , IL-1 β , IL-6 genlerindeki değişimin kontrolü amacıyla yapılmıştır. Gen ekspresyonu sonuçları, biyokimyasal parametreler ve histopatolojik bulgularla birlikte değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Beslenme, Diyet ve Enerji Metabolizması

Beslenme, sürdürülebilir sağlıklı yaşamın önemli bir gereğidir. Sağlıklı yaşam, çok sayıda faktöre bağlı olmakla birlikte temel besin maddelerinin dengeli ve sürekli tüketimi ile mümkündür. Besin maddeleri organizmada, fizyolojik ve biyokimyasal olayları yöneten birçok moleküler mekanizmayı etkiler. Diyetle alınan maddeler, çeşitli fonksiyonlarının yanı sıra organizma için gerekli enerjinin ana kaynağı olarak kullanılırlar (Guyton vd., 2007). Diyeti oluşturan maddeler ve bu maddelerin diyetteki oranları homeostazinin düzenlenmesinde rol oynarlar (Kim vd., 2004; Nakamura vd., 2014).

Metabolik enerji, yaşamın devam etmesi için gereklidir. Diyetle alınan enerjinin yetersiz olması ya da ihtiyaçtan fazla olması durumunda enerji metabolizmasında bozukluklar meydana gelir. Özellikle enerji bakımından zengin diyetle beslenmenin multifaktöriyel bir hastalık olan obeziteye yol açtığı bilinmektedir. Obezite dünya sağlık örgütü (World Health Organisation, WHO) tarafından, vücutta sağlığı bozacak düzeyde aşırı miktarda yağ birikmesi olarak tanımlanmaktadır (WHO, 2000). Organizmanın ihtiyacından fazla enerjinin diyetle sürekli alınması ile birlikte karaciğer, pankreas ve adipöz dokudaki bozuklukların yanı sıra dolaşım sistemi etkilenmekte ve kalp-damar sağlığı ile ilgili rahatsızlıklar şekillenmektedir (Ikemoto vd., 1996, Vidal-Alabro vd., 2012, Yang vd., 2012). Özellikle beslenme şekline bağlı olarak ortaya çıkan obezitenin karaciğer yağlanması, hiperlipidemi, koroner kalp hastalıkları, kalp krizi, hipertansiyon, diyabet ve kanser gibi birçok hastalığın oluşma riskini artırdığı ve dünya çapında yetişkin bireylerin % 20-25'inin obeziteyle ilişkili metabolik hastalıklara sahip olduğu bildirilmektedir (Yang vd., 2012, Hirako vd., 2015, Kogelman vd., 2015). Obeziteyle ilişkili hastalıklardan olan diyabet, 19. yy sonlarında 100 bin insanda 2-3 vaka olarak belirlenmişken, günümüzde nüfusun %7'den fazlasının diyabet hastası olduğu, 2020'de ise bu oranın ikiye katlanacağı tahmin edilmektedir (Johnson vd., 2007, WHO 2016).

Organizmada, diyetle alınan yağlar, yağ asitleri ve gliserole, karbonhidratlar fruktoz ve glikoz gibi basit şekerlere, proteinler ise aminoasitlere yıkılmaktadır. Fazla glikoz iskelet kası ve karaciğerde glikojene dönüştürülerek kısa süreli enerji ihtiyaçlarının karşılanmasında enerji kaynağı görevi görürken enerjinin uzun süreli depolanmasında ise lipogenez devreye girmekte ve fazla enerji yağ şeklinde depolanmaktadır (Murray vd., 2004). Glikoz, ince barsaklarda sindirilerek portal ven aracılığıyla karaciğer gelmekte ve bu organda glikojen, yağ asidi ve/veya aminoasitlerin metabolize edilmesinde kullanılmaktadır. Normal şartlarda kan glikoz düzeyi yüksek olduğunda insülin salgılanmakta ve karaciğer insüline yanıt olarak

glikozun bir kısmını glikojen şeklinde depolamaktadır. Glikojen depoları dolduğunda ise karaciğerde lipogenez başlamaktadır. Lipogenez hızı beslenmeye bağlı olarak değişmektedir. Fazla karbonhidrat içeren diyetler lipogenezi hızlandırırken, yağ içeriği yüksek diyetler veya kalori miktarı düşük diyetler lipogenez hızını azaltmaktadır (Guyton ve ark. 2007, Vidal-Alabro ve ark. 2012). Önceki çalışmalarda, diyetteki yağ miktarının fazla olmasıyla obezite ve insülin direnci gelişiminin tetiklendiği bildirilse de son zamanlarda yapılan çalışmalar diyetle bulunan yağın %10'dan fazla olması halinde lipogenezin baskılandığı, obezite ve komplikasyonlarının oluşumundan diyetteki karbonhidratların sorumlu olabileceği vurgulanmaktadır (Ikemoto ve ark. 1996, Küçükkaya 2008, Nishikata ve ark. 2011, Duarte ve ark. 2014).

Diyetteki önemli karbonhidrat kaynaklarından olan fruktoz, meyve şekeri olarak bilinmektedir. Kapalı formülü glikozun kapalı formülüne benzerdir. Kimyasal olarak birinci karbondaki aldehit grubu yerinde ikinci karbonunda bir keton grubu bulundurmasıyla glikozdan ayrılır. Gıdalarda daha çok tatlandırıcı olarak kullanılan fruktoz en çok sükroz ve YFMS'de bulunmaktadır. Fruktozun tatlandırıcı olarak kullanılmasının iki önemli sebebi vardır. Bunlardan birincisi ekonomik olması, ikincisi ise sükrozdan 1,73 kat daha fazla tatlılık hissi vermesidir. Bununla birlikte diyetle bulunan diğer maddelerin tatlılıklarını da artırmaktadır (Hanover ve White 1993).

Diyetle vücuda alınan fruktoz ince barsaklarda GLUT5 adı verilen fruktoz-spesifik taşıyıcı proteinleri sayesinde kolaylaştırılmış difüzyonla enterositlere alınır. Glikozun aksine fruktoz emilimi için Na^+ ve ATP hidrolizi gerekmez. Önemli miktarda fruktoz enterositlerde GLUT2 taşıyıcı proteinleri aracılığıyla kana geçer. Dolaşımla hızlı bir şekilde karaciğere gelen fruktoz burada GLUT2 taşıyıcı proteinleriyle hepatositlere alınır. Hepatositlerde kendisi için spesifik bir enzim olan fruktokinaz ile Fruktoz-1-fosfata dönüşür (Tappy ve Le 2010). Fruktoz-1-fosfat, Aldolaz B enzimiyle gliseraldehit ve dihidroksiaseton fosfat'a, oluşan bu ürünlerde gliseraldehit-3-fosfata dönüşür. Ortaya çıkan ürünler glukoneogenez ile glikoza veya piruvat üzerinden Asetil-CoA ve yağ asitlerine çevrilir.

Glikoz aktif transport ile emilirken fruktoz kolaylaştırılmış difüzyon ile ince barsak epitel hücrelerine alınır ve dolaşıma verilir. Metabolize edilirken hız kısıtlayıcı denetim noktası olan fosfokinetik basamağını atlayan fruktoz karaciğerde glikoza göre daha hızlı bir şekilde gliserol-3-fosfat ve Asetil-CoA oluşumuna sebep olur. Bu durum lipogenezin daha hızlı bir şekilde gerçekleşmesine yol açar (Elliot ve ark. 2002, Tappy ve Le 2010).

Fruktozun taşınması için gerekli olan GLUT5 reseptörleri pankreastaki β hücrelerinde bulunmamaktadır. Bu durum fruktozun insülin bağımsız metabolize

edilmesine yol açmakta ve leptin salınımı fruktoza bağlı olarak değişmemektedir. Ayrıca iştah hormonu olarak bilinen ghrelin, fruktoz tarafından baskılanmamaktadır (Guyton vd., 2007, Tappy ve Le 2010).

Karaciğerde fruktoz yaklaşık olarak %50 oranında glikoza, % 25 oranında laktata, %15 oranında glikojene, çok küçük bir kısmı ise serbest yağ asitlerine dönüşmektedir. Bu yüzden fazla miktarda fruktozun glikoz, laktat ve yağ asidi üretiminin artmasına sebep olarak yağ dokusunun artışı, karaciğer yağlanması ve insülin direnci gelişimine neden olduğu savunulmaktadır (Korkmaz 2008, Stanhope ve Havel 2008, Pang vd., 2016).

Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte fizyolojik ve biyolojik birçok olayı aydınlatmada genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi –omik çalışmaları ön plana çıkmıştır. Bu çalışmalar sayesinde çeşitli hücre ve dokulardaki DNA, RNA ve protein aktivitelerinin belirlenebilmesi mümkün olmuştur. Hücredeki bilgi akışının değerlendirilmesiyle hücre ve/veya dokulardaki fizyolojik aktivite hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir. Birçok çalışmada olduğu gibi metabolizma ile ilgili çalışmalarda da RNA düzeyinde moleküler çalışmalara başvurulmakta, transkripsiyon ve translasyon düzeyinde araştırmalar yapılmaktadır.

Çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan fizyolojik ve patolojik durumlar hücrelerde çeşitli RNA'ların ekspresyon düzeylerini değiştirmektedir. Bu değişikliklerin tespit edilmesinde RT-qPCR (Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. RT-qPCR teknolojisi gen ekspresyon çalışmalarında, yüksek sensitivite ve spesifite ile çalışmaya olanak sağlar. Bu teknoloji sayesinde hücre ve doku düzeyinde gen aktivitesi hakkında fikir sahibi olunabilmektedir (Vandesompele vd., 2002).

Diyette farklı oranlarda bulunan fruktozun karaciğer lipogenez ve inflamasyon ile ilişkili yolaklarda meydana getireceği değişimin tespiti enerji metabolizmasına bağlı meydana gelecek bozuklukların anlaşılmasında önemlidir. Çalışmada karaciğer dokusunda meydana gelen değişiklikler histopatolojik ve biyokimyasal parametrelerin yanı sıra RT-qPCR teknolojisinden yararlanılarak lipogenez ve inflamasyon yolağındaki bazı genlerdeki aktiviteler üzerinden incelenmiştir. Çalışmada aktivitesi araştırılan genlerle ilgili literatür bilgi aşağıda verilmiştir.

2.2. Çalışmada Aktivitesi Araştırılan Genler

2.2.1. FAS (Fatty Acid Synthase)

FAS'ın, diyetteki karbonhidratların yağa dönüşümünde öncelikli role sahip olduğu, SREBP-1c, ChREBP ve LXR α gibi lipogenik transkripsiyon faktörleri ile birlikte karaciğerde şekillenen lipogenezin kontrolünde görevli olduğu bildirilmektedir (Joseph vd., 2002; Chakravarthy vd., 2005). FAS aktivitesinin kontrol altına alınmasıyla insülin ile ilişkili metabolik bozukluklardan korunabileceği düşünülmektedir (Menendez ve ark. 2009). Lipogenez sürecinde yağ asidi üretimi Asetil-CoA aracılı FAS kataliziyle şekillenmektedir. Chakravarthy vd. (2005), FAS geni bakımından knockout farelerde yaptıkları bir çalışmada yağ asidi sentezinde bozukluklar meydana geldiğini bildirmişlerdir. İnsanlarda yapılan bir çalışma ile yağlı karaciğer bozukluğuna sahip insanların 2-3 kat daha fazla fruktoz tükettiği, bu insanların FAS gen ekspresyon düzeylerinde önemli oranda artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Ouyang vd., 2008). Farklı konsantrasyonlardaki fruktoz çözeltileriyle *ad libitum* beslenen ratlarda karaciğerdeki FAS aktivitesinin belirlenmesi önemlidir.

2.2.2. ACC (Acetyl CoA Carboxylase)

Diyetle alınan fruktozun %70'ten fazlası portal ven aracılığıyla *de novo* lipogenezin büyük oranda gerçekleştiği karaciğere gelerek burada metabolize edilmektedir. Hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda fazla miktarda tüketilen fruktozun karaciğerde ACC aktivitesini önemli oranda etkilediği ve lipogenezin önemli oranda bu gendeki aktiviteye bağlı olarak şekillendiği ortaya konulmuştur (Koo vd., 2008; Hirahatake vd., 2011). ACC aktivitesinin yüksek glikoza cevap olarak arttığı bildirilmektedir (Koo vd., 2008).

2.2.3. SCD-1 (Sterol CoA Desaturase 1)

Stearoyl-CoA desaturase, oleat ve diğer tekli doymamış yağ asitlerinin biyosentezinde görevli önemli bir enzimdir. Oleat, trigliseritlerin, kolesterol esterlerinin ve fosfolipitlerinin üretimi için gerekmektedir. Ayrıca oleat, sinyal transdüksiyonu, hücre farklılaşması, apoptoz ve beyinde gıda alımının düzenlenmesi gibi önemli biyolojik olaylarda görev almaktadır (Miyazaki vd., 2004). SCD-1, trigliserit ve diğer lipidlerin sentezi için gerekli, lipid ve karbonhidrat metabolizmasında merkezi role sahip bir enzimdir. Miyazaki vd. (2004) yaptıkları çalışmayla SREBP-1c bağımlı ve bağımsız yollarda diyetteki fruktozla birlikte

lipogenezin oluşabilmesi için Stearoyl-CoA desaturase enzimini kodlayan SCD-1 geninin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. SCD-1 geninin enerji tüketimini ve insülin hassasiyetini artırdığı, SCD-1 gen ekspresyonunun karaciğer steatozu gelişimi ile sıkı bir ilişki içerisinde olduğu bilinmektedir (Cohen vd., 2002; Ntambi vd., 2003; Miyazaki vd., 2004). SCD-1 bakımından knock-out farelerde yapılan bir çalışmada fruktozlu beslemeye bağlı olarak karaciğer glikojen miktarı ve plazma glikoz miktarlarında normal tip farelere göre önemli düzeyde azalma tespit edilmiştir. Çalışmada, ekspresyonu diyetle bulunan fruktoz, glikoz, yağ asitleri ve kolesterole bağlı olarak değişen ve regülasyonu önemli oranda SREBP-1c aracılı yolla düzenlenen bu genin, farklı fruktoz konsantrasyonlarına verdiği moleküler cevap araştırılmıştır.

2.2.4. ChREBP (Carbonhydrate Response Element Binding Protein)

ChREBP, MLXIPL (Max-like protein X interacting protein like) olarak da bilinir. SREBP'ler gibi sarmal kıvrım sarmal formda bir transkripsiyon faktörüdür. Mlx ile heterodimer oluşturarak ChoRE (Carbonhydrate Response Element)'e bağlanır. Oluşan heterodimer, FAS, ACC ve SCD-1 genlerinin ekspresyonlarını etkileyerek glikolitik, glikoneogenik ve lipogenik mekanizmaları düzenler. Başlıca karaciğer ve adipöz dokularında eksprese olan ChREBP, fazla karbonhidratın lipide dönüşümünde öncelikli öneme sahiptir. Diyetle alınan karbonhidrata ve bunun sonucunda salgılanan insüline bağlı olarak lipogenezin oluşumunu tetiklemektedir (Iizuka 2004; Ge vd., 2012; Iizuka 2013).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda öncelikli olarak lipogenezde görevli olan ChREBP'in hücre gelişimi ve/veya proliferasyonu süreçlerinde de etkin rol aldığı gösterilmiştir. ChREBP'in hücre proliferasyonuna olan katkısı hepatositlerdeki lipogenik aktivite, glikoz metabolizması ve hücre döngüsü arasındaki ilişki bakımından önemlidir (Filhoulaud vd., 2013; Sanders vd., 2016). Lipogenezde önemli bir faktör olduğu bilinen ChREBP'in yüksek glikoz varlığındaki aktivitesi ile ilgili çok sayıda çalışma varken, rasyonda değişen oranlarda bulunan fruktoza bağlı olarak değişen aktivitesi hakkında yeterince çalışma olmadığı anlaşılmıştır (Erion vd., 2012).

2.2.5. SREBP-1c (Sterol Regulator Element Binding Protein 1c)

SREBP-1c özellikle karaciğer ve adipöz dokuda çok sayıda genin ekspresyonunu düzenleyen ana transkripsiyon faktörüdür. Diyetle alınan enerji miktarına bağlı olarak

aktivitesi değişen bu transkripsiyon faktörü, obeziteyle ilişkili birçok hastalık bakımından önemlidir (Fernandez vd., 2011). SREBP-1c gen ekspresyon seviyesi beslenme durumu, açlık, tokluk gibi durumlarda lipogenik genlerle birlikte önemli derecede değişmektedir. Organizmada beslenmeye bağlı artan insülin miktarına cevap olarak de novo lipogeneze öncelikli görev almaktadır. SREBP-1c, lipogenez yolağındaki çok sayıda genin ekspresyonunu artırarak lipogenezi düzenlemektedir (Cha 2007). Fruktöz içerikli diyetlerin önemli oranda SREBP-1c aracılı metabolik aktiviteyle karaciğerde yağlanmaya neden olduğu bildirilmektedir (Kamei ve ark. 2008). SREBP-1c'nin, insüline bağlı olarak aktivitesinin değiştiği, bununla birlikte insülin gereksizsin direk olarak glikozla da aktif olabildiği ve insülinin genomik aktivitesinin SREBP-1c'den önemli düzeyde etkilendiği bildirilmektedir (Contreras vd., 2013; Gronning-Wang vd., 2013).

2.2.6. LXR α (Liver X Receptor alfa)

LXR α , nükleer transkripsiyon faktörlerinden olan Liver X Receptor ailesinin bir üyesidir. LXR ailesi kolesterol ve lipid biyosentezinde görevlidir. Bu ailenin üyelerinin (LXR α ve LXR β), RXR(Retinoid X Receptor) ile heterodimer oluşturarak lipid metabolizması ile ilgili çok sayıda genin regülasyonunda önemli rol alır. ChREBP ve SREBP-1c tarafından regüle edilen LXR α karaciğer trigliserit miktarını lipogenezi tetikleyerek düzenlemektedir. İnsüline bağlı olarak gen ekspresyonu değişen LXR α karaciğer dokusunda yağ depolanmasının regülasyonunda anahtar bir göreve sahiptir (Kamei vd., 2008; Matsusue vd., 2014).

2.2.7. TNF α (Tumor Necrosis Factor alfa)

İnflamasyon, yara iyileşmesi ve onarımı, apoptoz gibi immun sistemle ilişkili biyolojik olaylarda öncelikli görevli bir sitokin olan TNF α , karaciğerde gelişen bozukluklarda merkezi role sahiptir. Yapılan çalışmalarda hem beslenmeye bağlı hem de genetik olarak obez olan farelerde TNF α 'nın, karaciğerde trigliserit üretimini ve steatoz oluşumunu tetiklediği ve insülin direnci gelişimini uyarabileceği bildirilmektedir (Feldstein vd., 2004). Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması gibi metabolik bozukluklarda bu genin ekspresyon düzeylerinde artış meydana geldiği bildirilse de (Feldstein vd., 2004; Kanuri vd., 2011) farklı miktarlardaki fruktozun karaciğer yağlanması, steatoz ve fibröz doku gelişimi gibi karaciğerle ilgili bozukluklarda bu gen üzerindeki aktivitesi hakkında yeterince çalışma olmadığı anlaşılmıştır.

2.2.8. IL-1 β (Interleukin 1 beta)

İmmün sistemin regülasyonunda önemli görevlere sahip olan, hücre proliferasyonu ve apoptozis gibi hücreyel olaylarda aktivite gösteren, doku hasar göstergesi olarak protein düzeyinde takip edilebilen bir sitokindir. Bununla birlikte aktivitesi büyük oranda TNF α ve IL-6 ile birlikte olmaktadır. Fruktozlu beslemeye bağlı aktivitesi incelenen bir çalışmada IL-1 β 'nın karaciğerde gen ekspresyon seviyesinin normal beslenen gruba göre 3 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Castro vd., 2005). Başka bir çalışmada 21 gün boyunca normal diyetle ilaveten ad libitum %10'luk fruktoz çözeltisi verilen erkek ratlarda hepatositlerde IL-1 β gen ekspresyon seviyelerinin 2 kattan daha fazla arttığı belirlenmiştir (Castro vd., 2015). Normal diyetle ilaveten farklı konsantrasyonlardaki fruktozun 10 hafta boyunca tüketilmesiyle hepatositlerde IL-1 β gen ekspresyon seviyelerine olan etkilerinin incelenmesi önemlidir.

2.2.9. IL-6 (Interleukin 6)

İnflamasyon, immün cevap ve hematopoiesiste önemli görevler alan bir sitokindir. Doku hasarının bir göstergesi olarak ilgili dokuda protein düzeyinde artış gösterdiği bilinmektedir (Tanaka vd., 2014). IL-6, obezite gibi metabolik bozukluklarda gen ve protein ekspresyonu düzeyinde aktivite göstermektedir. Bu yüzden obezite ve komplikasyonları ile oluşan hastalıklar hafif inflamatuvar hastalıklar olarak anılmaktadır. İnflamasyona bağlı olarak mRNA ekspresyonu artan bu sitokinin, trigliserit sekresyonunun regülasyonunda da rol aldığı bildirilmektedir (Berköz ve Yalın 2008).

IL-6'nın alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması, tip 2 diyabet, insülin direnci gibi hastalıkların oluşumuna eşlik ettiği bununla birlikte anti inflamatuvar etkisi ve yararlarının bulunduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (Von Loeffelholz vd., 2017). Çalışmada inflamasyon yolağında aktivite gösteren bu sitokinin farklı konsantrasyonlardaki fruktoza bağlı olarak değişen aktivitesini incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali, Grupların Oluşturulması ve Besleme Periyodu

Proje önerisi Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2018/2-8 karar numarası ile onaylanmıştır. Çalışmada 32 Wistar albino erkek rat kullanılmıştır. Çalışmada K (Kontrol, normal diyet), F15 (Normal diyet+%15'lik fruktoz çözeltisi), F30 (Normal diyet+ %30'luk fruktoz çözeltisi) ve F60 (Normal diyet+%60'lık fruktoz çözeltisi) olmak üzere 4 farklı grup oluşturulmuştur (Tablo 1). Her grupta 8 rat bulundurulmuştur. Ratlar, vücut ağırlık ortalamaları bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmayacak şekilde gruplandırılmıştır ($P>0,05$). Ratların barındırılmasında polikarbonat malzemeden oluşan şeffaf kafesler kullanılmış ve her kafeste 4 rat bulundurulmuştur. Kontrol grubundaki ratlara normal yem ve su verilirken F15, F30 ve F60 gruplarındaki ratlara normal yem ve fruktoz çözeltileri *ad libitum* ve taze olarak sunulmuştur.

Tablo 1. Gruplardaki rasyon ve su/çözelti içerikleri

Grup	Rasyon	Su/Çözelti*
Kontrol (Kon)	Temel Rasyon	Su
Fruktoz 15 (F15)	Temel Rasyon	%15'lik Fruktoz çözeltisi
Fruktoz 30 (F30)	Temel Rasyon	%30'luk Fruktoz çözeltisi
Fruktoz 60 (F60)	Temel Rasyon	%60'lık Fruktoz çözeltisi

*Fruktoz çözeltileri, kristal fruktoz kullanılarak günlük hazırlanmıştır.

Çalışma boyunca ortamdaki ışık 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık (07:00-19:00 aydınlık, 19:00-07:00 karanlık), nem oranı %55 ve ortam sıcaklığı 21 ± 2 °C olacak şekilde düzenlenmiştir. Besleme periyodu 10 hafta sürdürülmüş ve haftalık vücut ağırlığı, yem, su ve çözelti tüketim miktarları kaydedilmiştir. Temel rasyonu oluşturan pellet yeme ait bilgiler tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Temel rasyon içeriği

Temel Rasyon	
Metabolik Enerji kcal/kg)	2600,00
Kuru madde (%)	88,40
Ham Protein(%)	22,50
Ham Selüloz (%)	8,10
Yağ (%)	3,15
Karbonhidrat (%)	54,72
HCl'de Çözülebilir Kül (%)	1,05
Diğer Bileşenler (%)	
Mısır	29,00
Tam Yağlı Soya	28,00
Ayçiçeği Küspesi	7,00
Buğday Razmolu	13,00
Yonca Unu	14,00
Et Kemik Unu	4,00
Melas	2,00
Kireç taşı	2,00
Dikalsiyum fosfat	0,50
Tuz	0,45
Vitamin-mineral premiksi	0,25
Kalsiyum	1,30
Fosfor	0,80

3.2. Ötenazi ile Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması

Besleme periyodu sonrası 12 saat aç bırakılan ratlara, anestezi altında (80 mg/kg Ketamine ve Xylazine, Intraperitoneal) kalpten kan alma yöntemiyle ötenazi uygulanmıştır. Gen ekspresyonu ve histopatoloji analizleri için karaciğer dokuları ikiye bölünerek moleküler analizler için alınan parça RNeasy lysis reagent içeren steril tüplere alınıp sıvı azotta hızlı bir şekilde dondurularak laboratuvara nakledilmiş ve -86 °C'de muhafaza edilmiştir. Diğer parça ise histopatolojik incelemeler için %10'luk formolde tespit edilmiştir.

3.3. Plazma analizleri

Ötenazi aşamasında alınan kan örnekleri +4 °C'de 15 dk santrifüj edilerek plazma elde edilmiştir. Plazma örnekleri glikoz, insülin, HDL, LDL, total kolesterol ve trigliserit parametrelerinin analizi için – 86 °C'de saklanmıştır. İnsülin seviyeleri rat spesifik ELISA kiti (Sunred Bio, China) ile ELISA reader (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, USA) aracılığıyla belirlenmiştir. Diğer biyokimyasal parametreler ise otoanalizör (Gesam Chem 200, Auto-Chemistry Analyzer, Gesam Production srl, Campobello, Italy)'de belirlenmiştir.

3.4. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Sıvı azotta dondurulduktan sonra -86 °C'de muhafaza edilen karaciğer dokularından yaklaşık 50 mg kullanılarak trizol metoduna göre total RNA izolasyonu yapılmıştır (Rio vd., 2010). TRI-Reagent kit (Sigma-Aldrich, USA, Kat. No:T9424) protokolüne göre kloroform, izopropil alkol, alkol aşamalarından sonra RNA pelletleri yaklaşık 10 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve örnekler pellet büyüklüklerine göre 30-100 µl nükleaz içermeyen su (NFW, Nuclease Free Water) ile sulandırılmıştır.

Örneklerin saflık ve konsantrasyon değerleri nükleik asit ölçer ile belirlenmiştir (Merinton, SMA1000). Yeterli saflık ve konsantrasyonda olan örnekler %1'lik agaroz jel elektroforezinde (100 V, 25 dk) kalite ve bütünlük bakımından değerlendirilirken, uygun olmayan örneklerden izolasyon tekrarlanmıştır.

Uygun saflık, konsantrasyon ve kalitedeki örnekler cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA dönüşümü öncesi örnekler olası genomik DNA kontaminasyonuna karşı DNaz (DNase I, RNase free, ThermoFischer Scientific, USA Cat. No: EN0521) ile muamele edilmiştir. cDNA sentezi thermal cycler'da (Biorad T100, USA) 42 °C'de 60 dk, 25 °C'de 5 dk ve 70 °C'de 5 dk olacak şekilde düzenlenmiştir. Reaksiyon sonrası cDNA örneklerinin son hacmi NFW ile 200 µl'ye tamamlanmıştır.

3.5. Real Time PCR (RT-qPCR) ile Gen Ekspresyonu Analizi

Karaciğerde lipogenezde görevli SREBP-1c, ChREBP, LXRα, FAS, ACC, SCD-1 ile inflamasyonda görevli TNFα, IL-1β ve IL-6 genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-qPCR aracılığıyla belirlenmiştir (ROTORGENE QIAGEN, USA). RT-qPCR protokolü 95 °C'de 10 dakikalık denatürasyon sonrası 95 °C'de 15 saniye, 60 °C'de 60 saniye, 72 °C'de 30 saniye

ve 40 siklus olacak şekilde düzenlenmiştir. Internal kontrol olarak PPIA housekeeping geni kullanılmıştır. Bütün örneklerden triplike çalışılmıştır. İlgili genlerin amplifikasyonu için SYBR Green boya içeren kit kullanılmıştır (Power SYBR Green PCR Master Mix, ThermoFisher Scientific, USA). Kullanılan primerler NCBI-Primer BLAST'ta kontrol edildikten sonra kullanılmıştır. Primerlerin forward ve reverse dizileri tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Amplifikasyonu Yapılan Genlerin Forward ve Reverse Primer Dizileri

Genler	Erişim No	Forward ve Reverse Primer Sequences	Kaynak
PPIA	NM_017101.1	F: 5'-CAGACAAAGTTCCAAAGACAGCA-3' R: 5'-CACCCTGGCACATGAATCCT-3'	dos Santos vd., 2016
FAS	NM_017332.1	F: 5'-GCTGCTACAAACAGGACCATC-3' R: 5'- TCCACTGACTCTTCACAGACCA-3'	Mock vd., 2017
ACC	NM_022193.1	F: 5'- CAATCCTCGGCACATGGAGA-3' R:5'- GCTCAGCCAAGCGGATGTAGA-3'	Gou vd., 2016
SCD-1	NM_139192.2	F: 5'- CCTTAACCCTGAGATCCCGTAGA-3' R: 5'- AGCCCATAAAAGATTTCTGCAAA-3'	Yasari vd., 2010
ChREBP	NM_133552.1	F: 5'-CGGGACATGTTTGATGACTATGTC-3' R: 5'-AATAAAGGTCGGATGAGGATGCT-3'	He vd., 2004
SREBP-1c	NM_001276707.1	F: 5'-GCAACACTGGCAGAGATCTACGT-3' R: 5'-TGGCGGGCACTACTTAGGAA-3'	He vd., 2004
LXRα	NM_031627.2	F: 5'- CCTGATGTTTCTCCTGACTC-3' R: 5'- TGA CTCCAACCCTATCCTTA-3'	Mohammadi vd., 2013
TNFα	NM_012675.3	F: 5'-GGCATGGATCTCAAAGACAACC-3' R: 5'-CAAATCGGCTGACGGTGTG-3'	Castro vd., 2015
IL-1β	NM_031512.2	F:5'-ACAAGGAGAGACAAGCAACGAC-3' R: 5'-TCTTCTTTGGGTATTGTTTGGG-3'	Castro vd., 2015
IL-6	NM_012589.2	F: 5'-TGATGGATGCTTCCAAACTG-3' R: 5'-GAGCATTGGAAGTTGGGGTA-3'	Khan vd., 2013

3.6. Histopatolojik İncelemeler

Formalinde tespit edilen dokulardan yaklaşık 5 µ kalınlığında alınan kesitler ksilolde deparafinize edilip sırasıyla 100, 96, 80 ve 70'lik alkol serilerinden geçirilmiştir. Daha sonra Hematoksilen Eozin (H&E) yöntemi ile boyanarak (Luna, 1968) doku kesitleri ışık mikroskop altında (Olympus CX31) incelendikten sonra mikrofotografı (Olympus DP12) alınmıştır.

Histopatolojik bulguların değerlendirilmesi şu kriterlere göre yapılmıştır:

Derece 0: Histopatolojik değişiklik % 5'in altında;

Derece 1: Tüm alanın %5 ile %33'ü arasında meydana gelen hafif histopatolojik değişiklikler;

Derece 2: Tüm alanın %33 ile %66'sı arasındaki alanda meydana gelen orta derecede histopatolojik değişiklikler;

Derece 3: Tüm alanın %66'sından daha fazla alanda meydana gelen ağır histopatolojik değişiklikler.

3.7. İstatistiksel analiz

İstatistiksel hesaplamalar SPSS paket program (Version SPSS 22.0) aracılığıyla yapılmıştır. Gruplar arası istatistiksel farklılık One Way ANOVA ve Tukey testi ile belirlenerek, $P < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Gen ekspresyon sonuçları ise $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemiyle değerlendirilerek kat değişimi olarak hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

Histopatolojik bulgulardaki skor ortalamaları Tepe Değeri olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Haftalık Temel Rasyon, Su/Çözeltili Tüketimleri ve Vücut Ağırlığı Değişimleri

Kontrol, F15, F30 ve F60 gruplarındaki ratların 10 haftalık besleme periyodu sonrası haftalık ortalama yem tüketimleri sırasıyla $258,52 \pm 2,83$, $150,29 \pm 3,54$, $135,57 \pm 3,57$ ve $87,97 \pm 1,93$ g olarak belirlenmiştir ($P < 0,001$). En az yem tüketiminin F60 grubunda olduğu görülmüştür. Bununla birlikte haftalık su ve fruktoz çözeltisi tüketim miktarları $468,00 \pm 6,88$, $554,67 \pm 41,79$, $327,17 \pm 9,44$ ve $211,72 \pm 6,09$ ml olmuştur ($P < 0,001$). F15 grubunun fruktoz çözeltisini (%15) en çok tüketen grup olduğu belirlenmiştir (Tablo 4).

Besleme periyodu başlangıcında gruplar arasında vücut ağırlığı ortalamaları bakımından önemli bir fark bulunmazken ilk haftanın sonunda F15 ve F30 grubundaki ratların F60 grubuna göre vücut ağırlığı ortalamalarının önemli şekilde arttığı görülmüştür ($P < 0,05$). Çalışmanın 3. haftası en zayıf grubun F60 grubu olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 3. hafta F15 ve F30 gruplarının F60 grubuna göre ağırlık ortalamaları bakımından anlamlı farklılığın olduğu ilk haftadır. Bu anlamlı farklılık 8. haftaya kadar devam etmiştir. F15 ve F60 gruplarındaki ratların vücut ağırlığı ortalamaları çalışma sonuna kadar benzer devam etmiştir. F60 grubu bazı haftalar kontrol ve diğer gruplardan düşük bulunurken çalışma sonunda yaklaşık 495 g ağırlık ortalaması ile F30'un en ağır grup, F60'ın ise en hafif grup olduğu belirlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Gruplardaki haftalık vücut ağırlığı ortalamaları ile yem ve su/çözelti tüketim miktarları[&]

Hafta	Özellik	Kon	F15	F30	F60	P
0	Vücut ağırlığı (g)	209,38±7,50	208,50±7,89	206,88±9,82	206,75±9,75	-
	Vücut ağırlığı (g)	254,04±11,16 ^{a,b}	261,31±7,99 ^a	260,05±10,67 ^a	220,36±9,95 ^b	*
1	Tüketilen yem (g/rat)	253,13	160,72	144,38	80,00	
	Tüketilen su/çözelti (ml/rat)	426,25	375,56	277,22	177,22	
2	Vücut ağırlığı (g)	296,12±14,22	297,16±8,52	297,78±14,14	255,55±13,88	-
	Tüketilen yem (g/rat)	248,50	156,78	143,22	86,67	
	Tüketilen su/çözelti (ml/rat)	471,25	405,56	298,33	202,78	
3	Vücut ağırlığı (g)	338,63±14,40 ^a	352,21±6,63 ^a	348,24±14,22 ^a	276,40±15,95 ^b	**
	Tüketilen yem (g/rat)	256,38	171,11	152,22	89,56	
	Tüketilen su/çözelti (ml/rat)	463,13	528,89	345,00	196,11	
4	Vücut ağırlığı (g)	369,15±16,00 ^{a,b}	380,10±7,68 ^a	387,11±14,55 ^a	320,51±13,60 ^b	**
	Tüketilen yem (g/rat)	258,90	150,21	146,62	99,56	
	Tüketilen su/çözelti (ml/rat)	471,25	541,11	327,22	216,67	
5	Vücut ağırlığı (g)	394,19±18,57 ^{a,b}	401,18±5,28 ^a	417,19±14,42 ^a	342,13±14,28 ^b	**
	Tüketilen yem (g/rat)	270,63	153,33	137,38	93,16	
	Tüketilen su/çözelti (ml/rat)	481,25	443,89	348,89	212,22	
6	Vücut ağırlığı (g)	418,61±19,94 ^a	425,58±6,35 ^a	436,85±15,74 ^a	359,89±15,38 ^b	**
	Tüketilen yem (g/rat)	260,29	138,72	134,67	87,56	
	Tüketilen su/çözelti (ml/rat)	438,13	685,00	335,00	221,67	
7	Vücut ağırlığı (g)	425,03±19,04 ^{a,b}	444,93±5,42 ^a	457,00±16,14 ^a	376,30±15,89 ^b	**
	Tüketilen yem (g/rat)	265,06	152,80	128,44	90,71	
	Tüketilen su/çözelti (ml/rat)	482,50	598,33	290,56	211,11	
8	Vücut ağırlığı (g)	439,91±21,31 ^{a,b}	454,98±5,80 ^{a,b}	463,73±16,68 ^a	393,61±16,92 ^b	*
	Tüketilen yem (g/rat)	251,13	134,56	125,56	88,56	
	Tüketilen su/çözelti (ml/rat)	480,63	524,44	350,00	211,67	
9	Vücut ağırlığı (g)	458,15±23,41	468,79±6,65	485,15±17,33	423,44±15,43	-
	Tüketilen yem (g/rat)	247,71	139,10	115,91	78,30	
	Tüketilen su/çözelti (ml/rat)	465,63	638,33	327,78	215,00	
10	Vücut ağırlığı (g)	460,56±23,15 ^{a,b}	475,93±4,98 ^{a,b}	494,00±17,51 ^a	424,15±15,72 ^b	*
	Tüketilen yem (g/rat)	273,44	145,61	127,31	85,62	
	Tüketilen su/çözelti (mL/rat)	500,00	805,56	391,67	252,78	
Ort	Tüketilen yem (g/rat)	258,52±2,83 ^a	150,29±3,54 ^b	135,57±3,57 ^c	87,97±1,93 ^d	***
	Tüketilen su/çözelti (mL/rat)	468,00±6,88 ^b	554,67±41,79 ^a	327,17±9,44 ^c	211,72±6,09 ^d	***

*: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001

a, b, c, d: Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasında anlamlı farklılığı göstermektedir.

Kon: Kontrol grubu; F15: %15'lik Fruktöz çözeltisiyle beslenen grup; F30: %30'luk fruktoz çözeltisiyle beslenen grup; F60: %60'lık fruktoz çözeltisiyle beslenen grup, Ort: Ortalama

&: Tabloda tüketilen su ve çözelti miktarları ml cinsinden belirtilmiştir. Kontrol grubundaki ratlar su tüketirken, diğer gruplardaki ratlar belirtilen konsantrasyonlardaki fruktoz çözeltilerini tüketmişlerdir.

4.2. Karaciğer ağırlıkları ve Plazma Analizi Bulguları

Karaciğer ağırlığı ortalamaları bakımından en yüksek ortalamanın $15,95 \pm 0,58$ g ile F30 grubunda olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Kon, F15 ve F60 karaciğer ağırlık ortalamaları ise benzer bulunmuştur (Tablo 5).

Yapılan plazma analizleri sonucu elde edilen bazı biyokimyasal parametreler ise tablo 4'te gösterilmiştir. Plazma glikoz seviyelerinin $215,13 \pm 23,11$ mg/dl ile en yüksek F60 grubunda olduğu görülmüştür. İnsülin, HDL ve total kolesterol değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmazken, plazma LDL seviyeleri bakımından F60 grubunun önemli düzeyde yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir ($P < 0,01$). Ayrıca fruktoz çözeltisi ile beslenen bütün gruplarda (F15, F30 ve F60) trigliserit seviyelerinin kontrol grubu seviyelerinin yaklaşık iki katından daha fazla değerlerde olduğu ve bu farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,01$).

Tablo 5. Gruplardaki hayvanların karaciğer ağırlıkları ile bazı biyokimyasal parametreler

Parametreler	Kon	F15	F30	F60	P
Karaciğer ağırlığı (g)	$13,06 \pm 1,10^b$	$14,58 \pm 0,36^{ab}$	$15,95 \pm 0,58^a$	$13,11 \pm 0,72^{ab}$	*
Glikoz (mg/dl)	$177,75 \pm 7,97$	$178,75 \pm 4,06$	$182,38 \pm 11,57$	$215,13 \pm 23,11$	-
İnsülin (mIU/l)	$2,57 \pm 0,05$	$2,49 \pm 0,06$	$2,58 \pm 0,07$	$2,59 \pm 0,15$	-
LDL (mg/dl)	$14,00 \pm 0,27^b$	$17,38 \pm 0,84^{ab}$	$18,00 \pm 1,54^{ab}$	$21,50 \pm 1,86^a$	**
HDL (mg/dl)	$29,75 \pm 1,36$	$32,50 \pm 2,08$	$28,63 \pm 1,90$	$27,50 \pm 2,16$	-
T.Kolesterol (mg/dl)	$32,38 \pm 1,13$	$34,88 \pm 2,47$	$33,88 \pm 2,39$	$34,00 \pm 2,10$	-
Trigliserit (mg/dl)	$40,88 \pm 3,76^b$	$80,25 \pm 11,36^a$	$99,25 \pm 11,23^a$	$91,50 \pm 10,80^a$	**

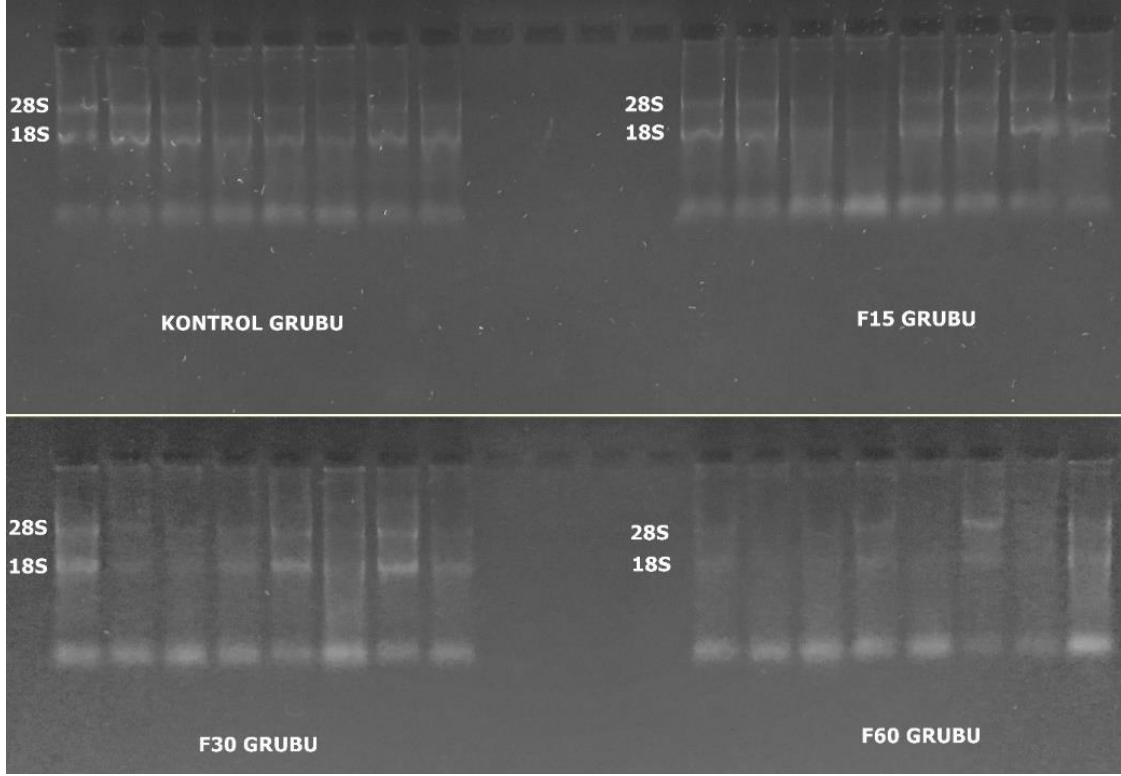
*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$

a, b: Aynı satırdaki farklı harfler gruplar arasında anlamlı farklılığı göstermektedir.

Kon: Kontrol grubu; F15: %15'lik Fruktoz çözeltisiyle beslenen grup; F30: %30'lık fruktoz çözeltisiyle beslenen grup; F60: %60'lık fruktoz çözeltisiyle beslenen grup

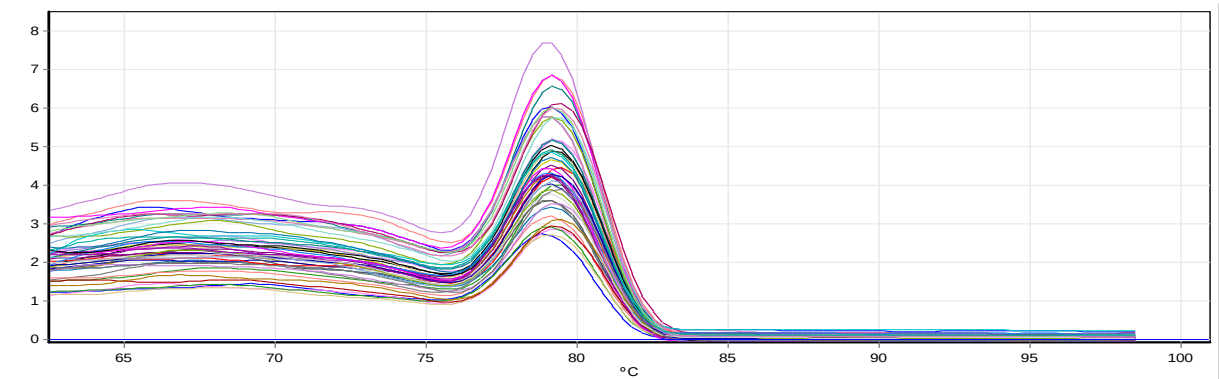
4.3. RNA İzolasyonu ve Gen Ekspresyonu Bulguları

Trizol yöntemine göre yapılan total RNA izolasyonunda saflık göstergesi olan A260/280 oranı $1,94 \pm 0,02$ olurken, konsantrasyon değerleri $322,57 \pm 26,02$ ng/μl olmuştur. Dokulardan yapılan RNA izolasyonu sonrası elde edilen jel elektroforez görüntüsü Şekil 1'de verilmiştir.

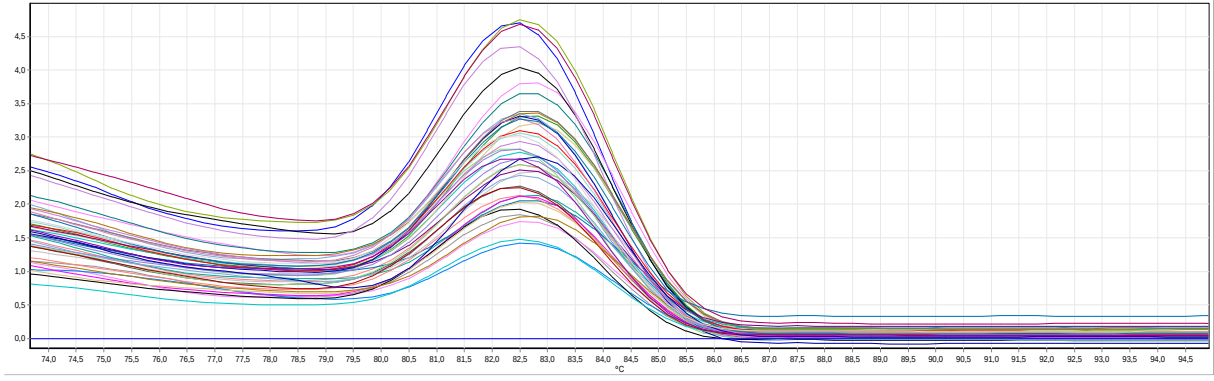


Şekil 1. Gruplardaki örneklerin 28S ve 18S rRNA ünitelerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri [Her grupta 8 hayvanın (sırasıyla soldan sağa 1-8) karaciğer dokularından izole edilen total RNA agaroz jeldeki görüntüleri].

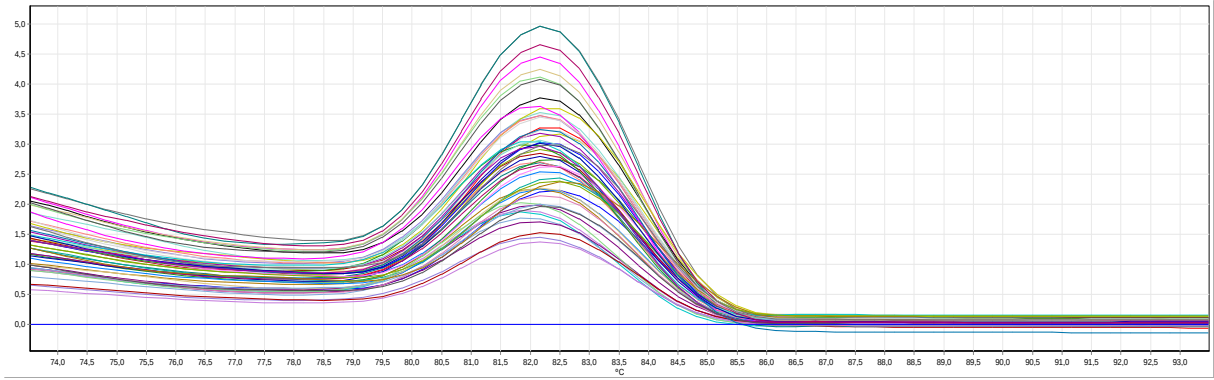
Yeterli saflık ve konsantrasyondaki örneklerden yapılan cDNA sentezi sonrası FAS, ACC, SCD-1, ChREBP, SREBP-1c, LXR α , TNF α , IL-1 β ve IL-6 genlerinin ekspresyon seviyeleri RT-qPCR’da belirlenmiştir. RT-qPCR’da elde edilen erime eğrisi (melting curve) grafikleri şekil 2-11’de verilmiştir. Ayrıca Ct grafikleri şekil 12-21’de gösterilmiştir.



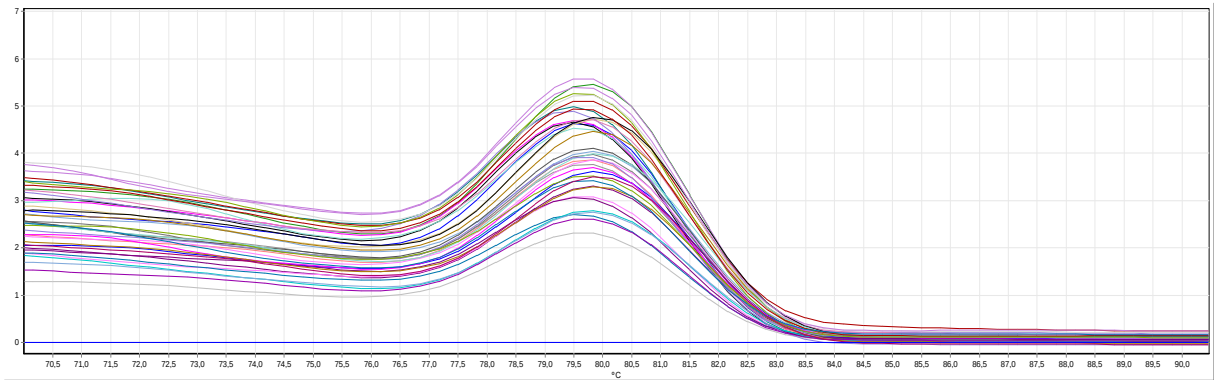
Şekil 2. PPIA erime eğrisi grafiği



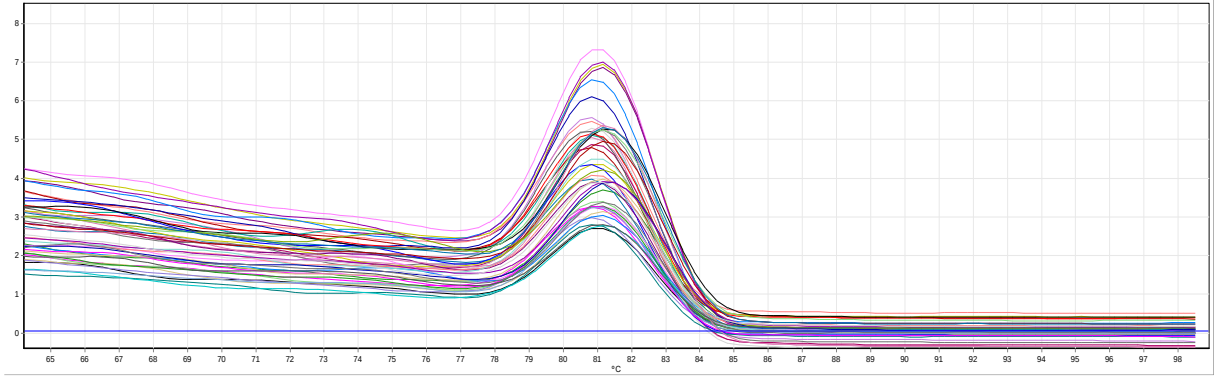
Şekil 3. FAS erime eğrisi grafiği



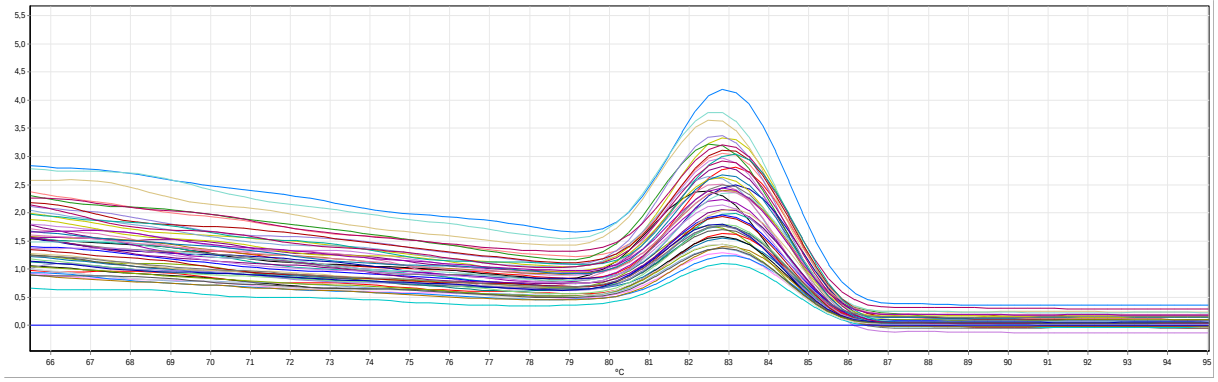
Şekil 4. ACC erime eğrisi grafiği



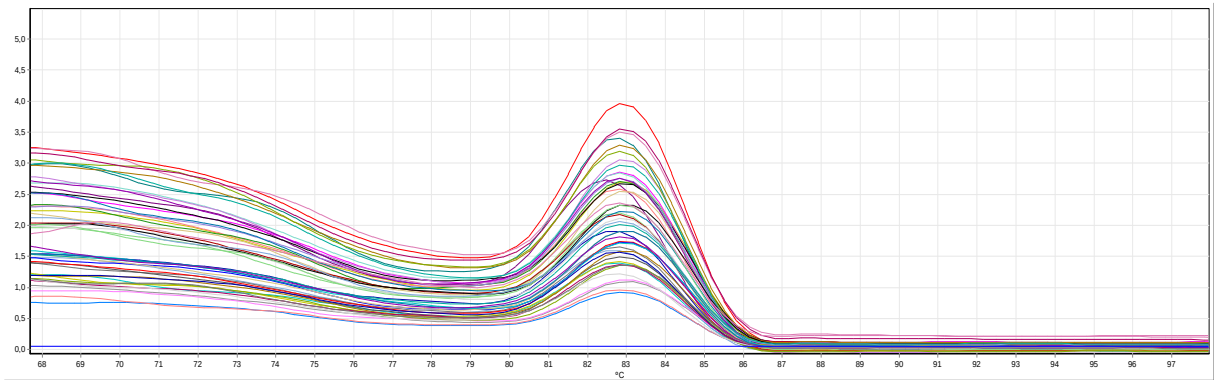
Şekil 5. SCD-1 erime eğrisi grafiği



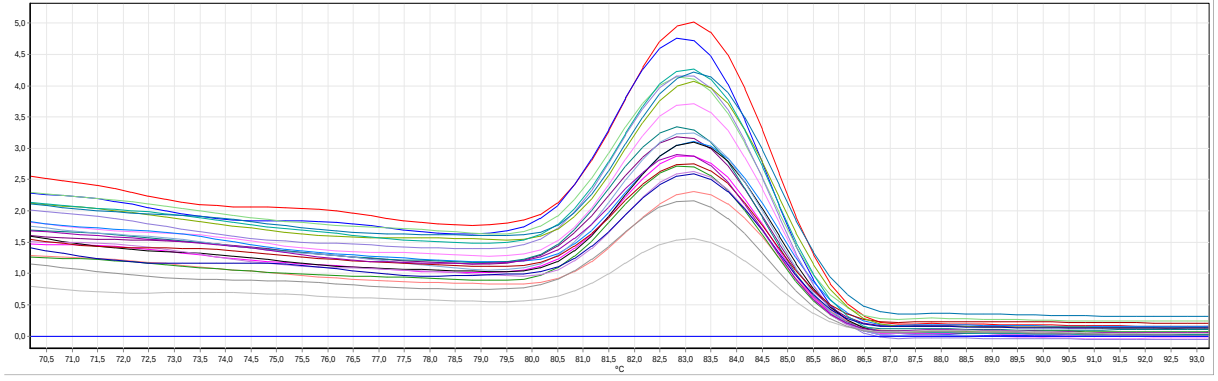
Şekil 6. ChREBP erime eğrisi grafiği



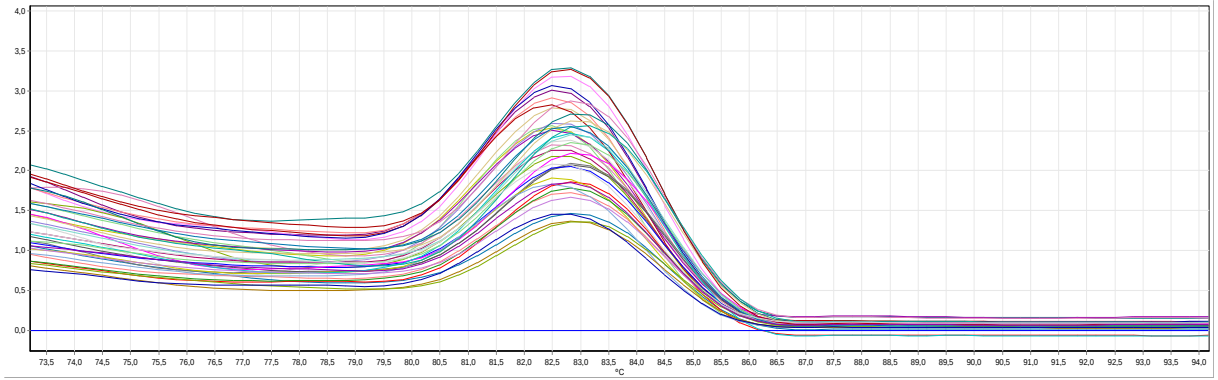
Şekil 7. SREBP-1c erime eğrisi grafiği



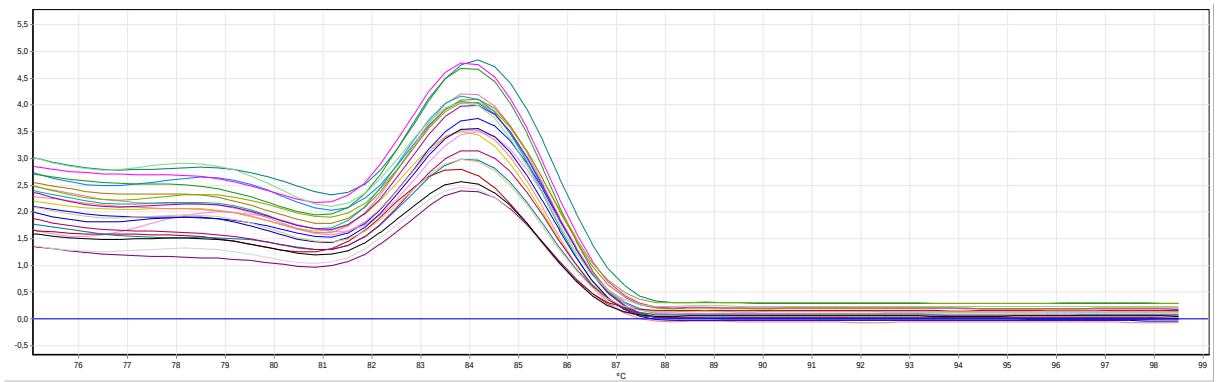
Şekil 8. LXRα erime eğrisi grafiği



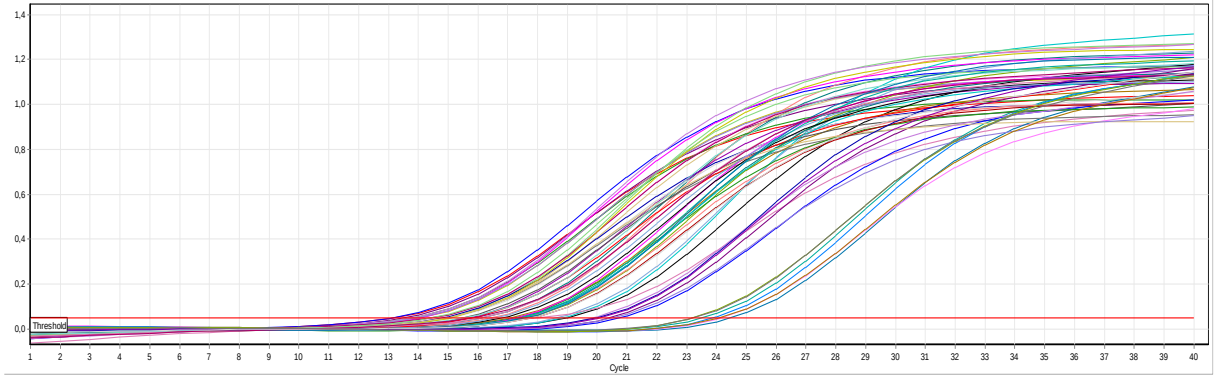
Şekil 9. TNFα erime eğrisi grafiği



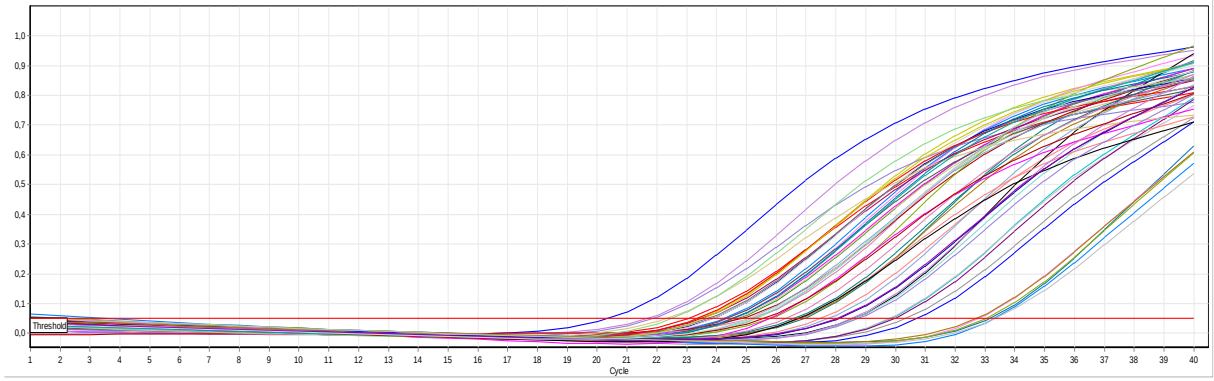
Şekil 10. IL-1β erime eğrisi grafiği



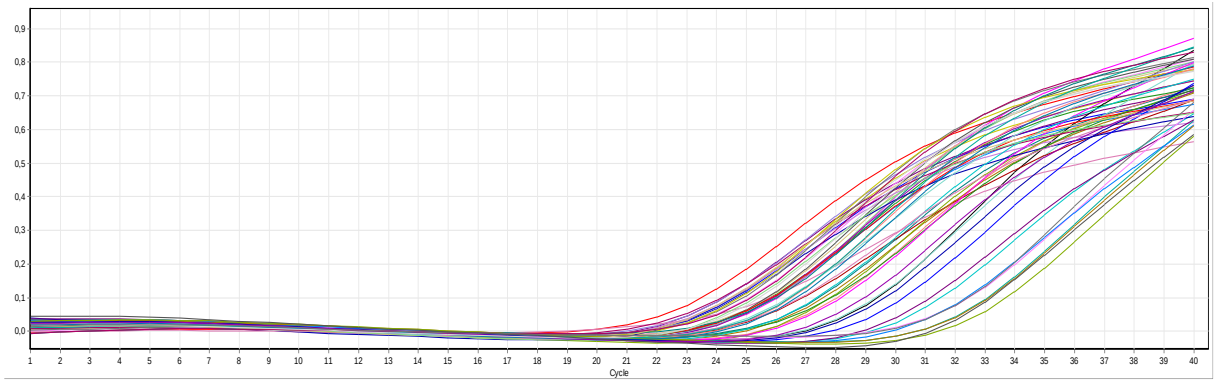
Şekil 11. IL-6 erime eğrisi grafiği



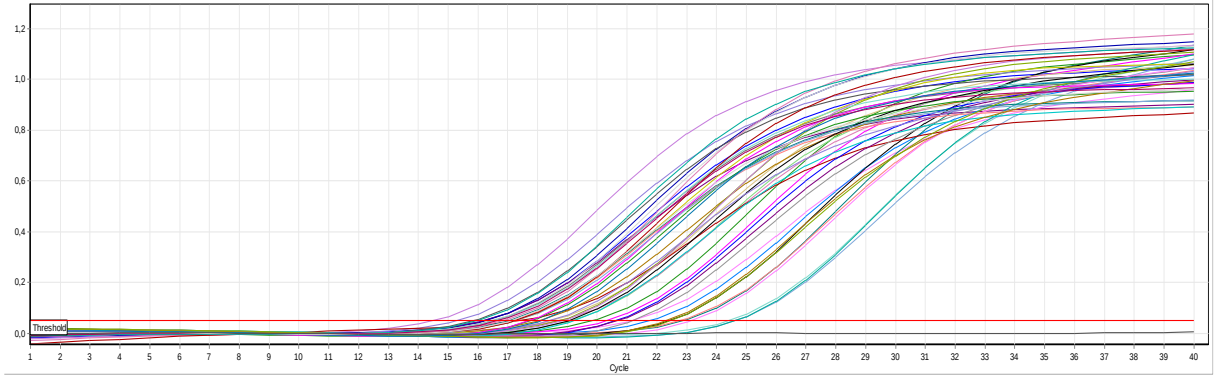
Şekil 12. PPIA Ct grafiği



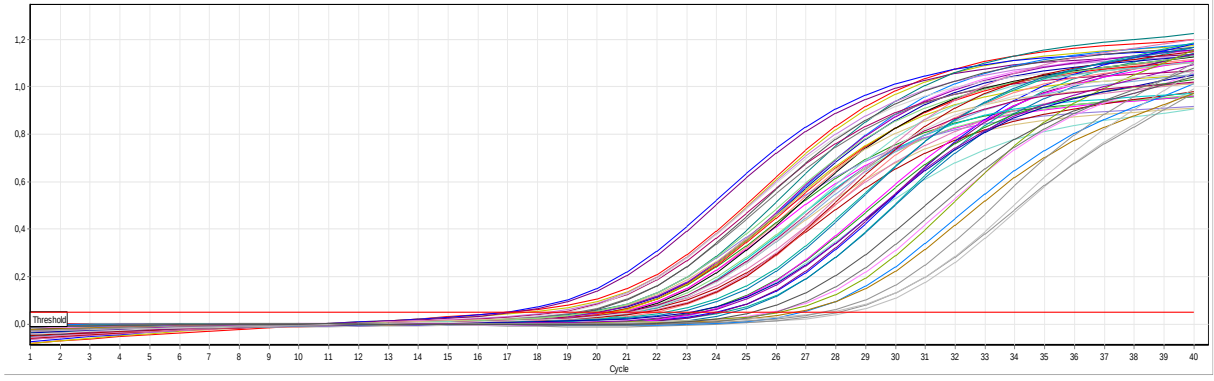
Şekil 13. FAS Ct grafiği



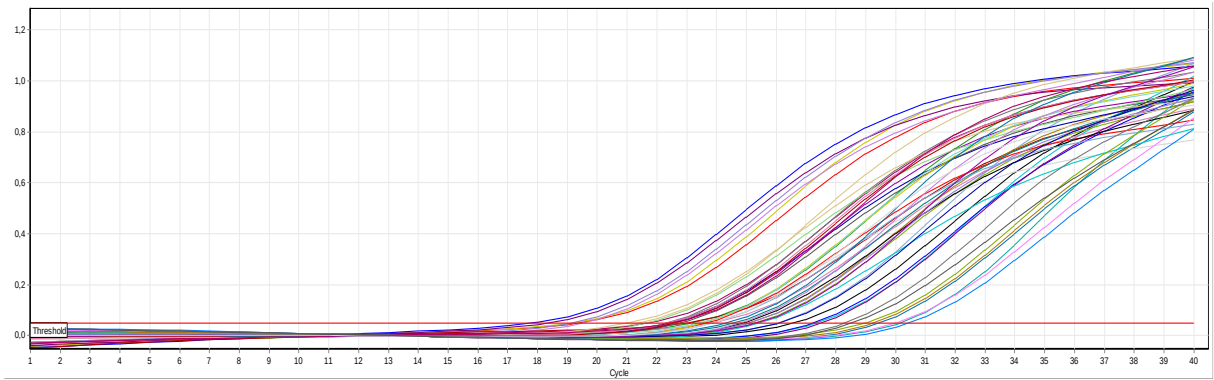
Şekil 14. ACC Ct grafiği



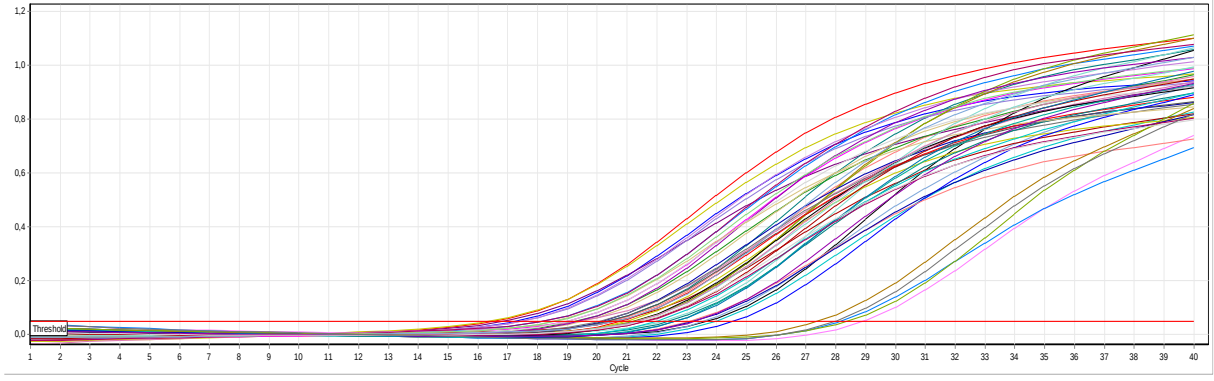
Şekil 15. SCD-1 Ct grafiği



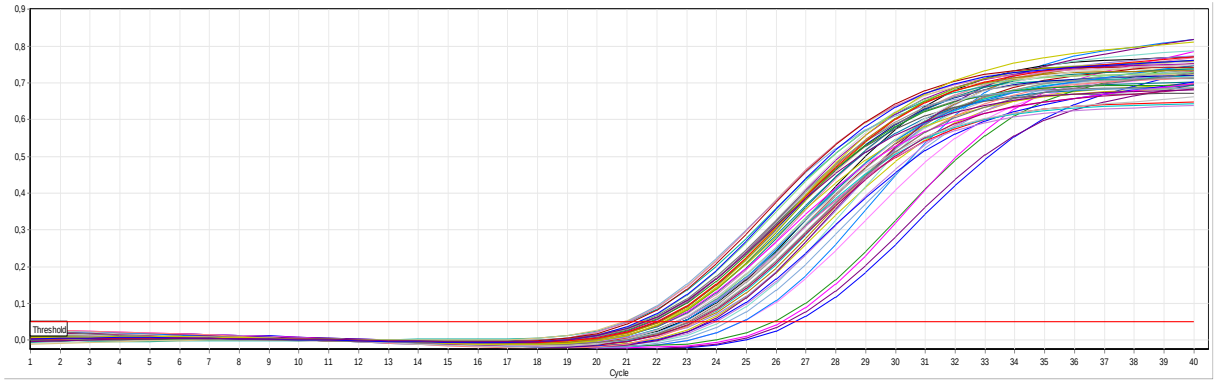
Şekil 16. ChREBP Ct grafiği



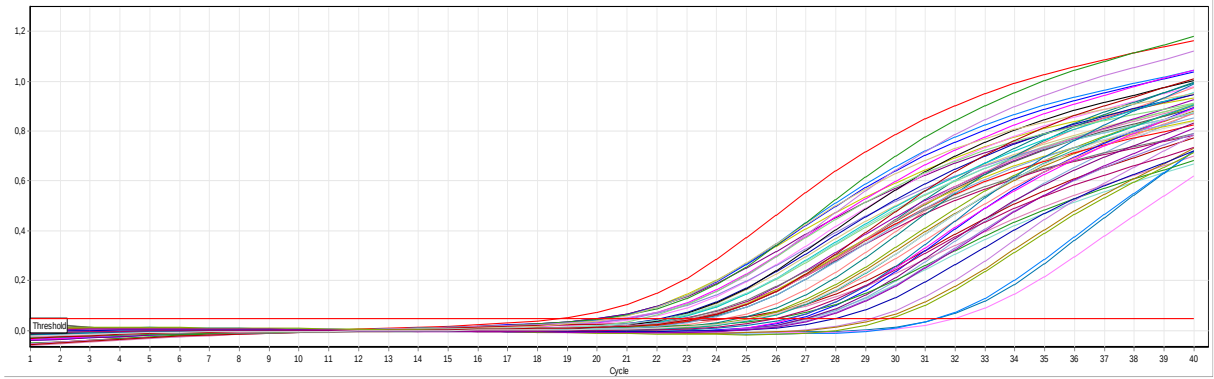
Şekil 17. SREBP-1c Ct grafiği



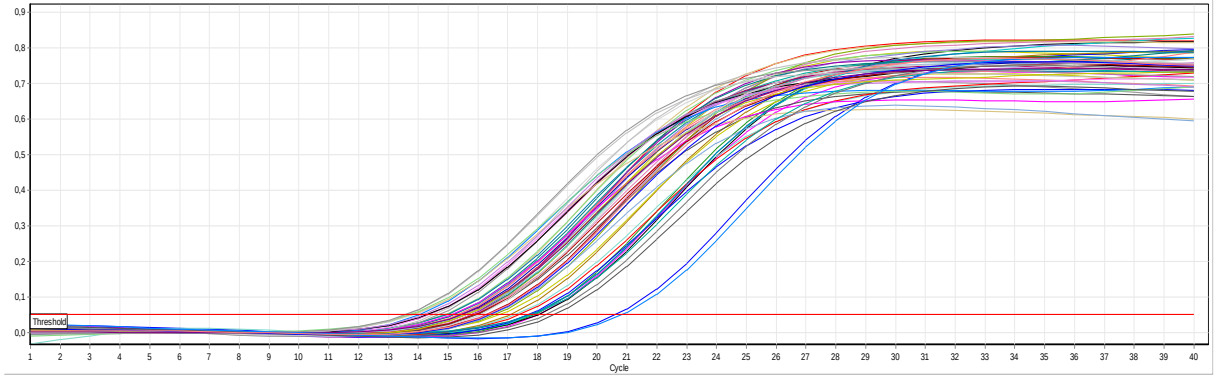
Şekil 18. LXRα Ct grafiği



Şekil 19. TNFα Ct grafiği



Şekil 20. IL-1β Ct grafiği



Şekil 21. IL-6 Ct grafiği

Genlerin mRNA kat değişimleri tablo 6'da verilmiştir. F30 ve F60 gruplarındaki ratların karaciğer dokularında TNF α gen ekspresyon düzeyleri yaklaşık 4 kat upregüle olurken ($P<0,05$), F15 grubundaki upregülasyonun yaklaşık 3 kat olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte IL-1 β gen ekspresyon değerlerinin F15, F30 ve F60 gruplarında sırasıyla $1,66\pm0,94$, $2,28\pm0,53$, $3,27\pm0,98$ olduğu tespit edilmiştir. IL-6 gen ekspresyonu değerleri bakımından F30 ve F60 gruplarında 2 kattan fazla upregülasyon görülürken ($P<0,05$), F15 grubunda önemli bir değişim olmadığı belirlenmiştir.

Lipogenez yolağında görevli olan SREBP-1c deneme gruplarının tamamında değişen önem dereceleriyle upregüle olmuştur (F15, F30 ve F60 gruplarında sırasıyla $P<0,05$; $P<0,05$; $P<0,01$). SREBP-1c ve ChREBP genleri bakımından en yüksek upregülasyon F60 grubunda olurken, LXR α 'nın gruplarda benzer ekspresyon değerleri gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte F15 grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat fazla ifade edilmiştir. Ayrıca, F15, F30 ve F60 gruplarında FAS gen ekspresyon seviyelerinin yaklaşık 3 kat upregüle olmuştur ($P<0,05$). ACC gen ekspresyon seviyeleri deneme gruplarında değişen önem düzeylerinde artış gösterirken (F15, F30 ve F60 gruplarında sırasıyla $P<0,05$; $P<0,05$; $P<0,001$) en fazla F15 grubunda (yaklaşık 4 kat) artış göstermiştir. Deneme gruplarında incelenen genlerden ekspresyon seviyelerinde en fazla artış gösteren genin F15, F30 ve F60 gruplarında sırasıyla yaklaşık 7 ($P<0,001$), 8 ($P<0,001$) ve 12 ($P<0,01$) kat fazla ifade edilen SCD-1 geni olduğu belirlenmiştir.

Tablo 6. Gruplarda karaciğer dokularında hedef genlere ait mRNA kat değişimleri

	Kon	F15	F30	F60
TNFα	1,00 $\pm$ 0,11	2,85 $\pm$ 0,86	3,94 $\pm$ 1,25*	3,60 $\pm$ 1,10*
IL-1β	1,00 $\pm$ 0,17	1,66 $\pm$ 0,94	2,28 $\pm$ 0,53	3,27 $\pm$ 0,98
IL-6	1,00 $\pm$ 0,28	1,37 $\pm$ 0,15	2,59 $\pm$ 0,66*	2,29 $\pm$ 0,43*
SREBP-1c	1,00 $\pm$ 0,26	2,63 $\pm$ 0,73*	1,94 $\pm$ 0,33*	4,29 $\pm$ 0,83**
ChREBP	1,00 $\pm$ 0,24	2,63 $\pm$ 0,73*	2,49 $\pm$ 0,68	3,07 $\pm$ 0,85*
LXRα	1,00 $\pm$ 0,15	1,87 $\pm$ 0,63	0,87 $\pm$ 0,136	1,03 $\pm$ 0,24
FAS	1,00 $\pm$ 0,22	3,05 $\pm$ 0,88*	2,29 $\pm$ 0,49*	2,79 $\pm$ 0,69*
ACC	1,00 $\pm$ 0,14	4,11 $\pm$ 1,49*	2,40 $\pm$ 0,59*	2,74 $\pm$ 0,21***
SCD-1	1,00 $\pm$ 0,49	7,05 $\pm$ 1,09***	8,63 $\pm$ 1,65***	12,63 $\pm$ 3,15**

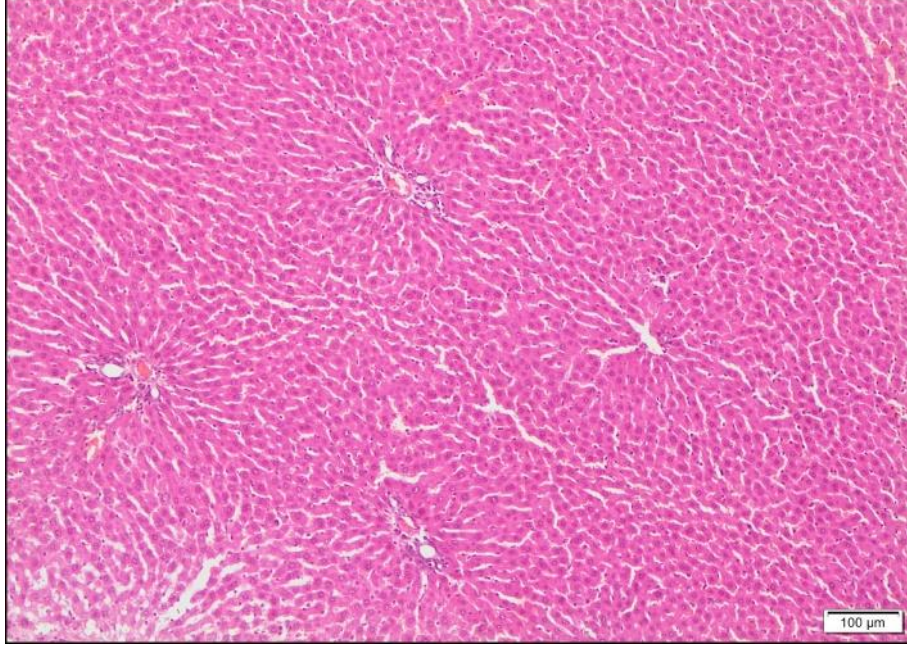
*: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001

4.4. Histopatolojik Bulgular

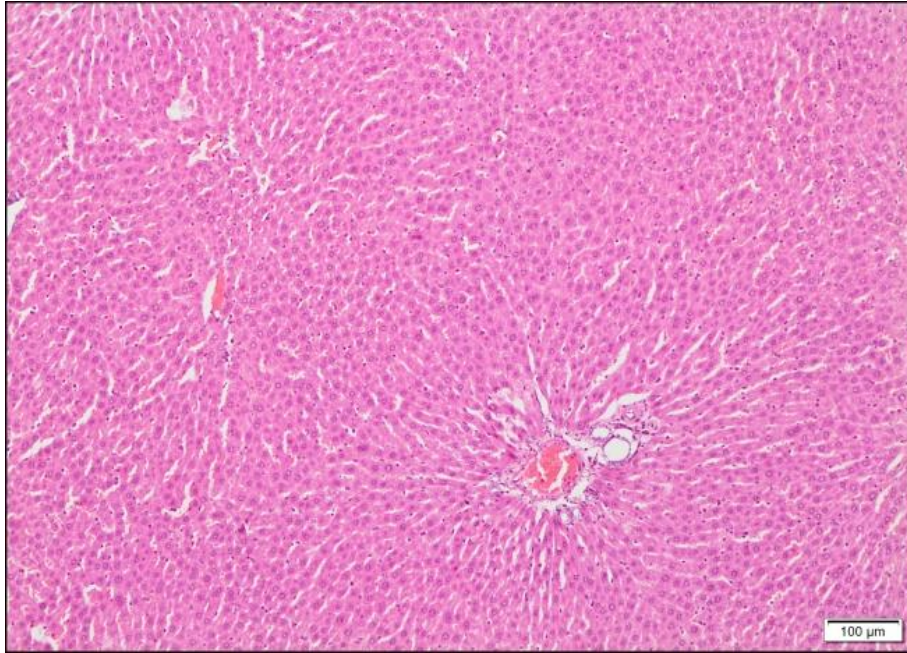
Ötenazi sonrası tüm hayvanlara nekropsi yapılmıştır. Makroskobik incelemelerde F60 grubunda daha şiddetli olmak üzere F30 ve F60 gruplarındaki hayvanlara ait karaciğerlerin şişkin, koyu kırmızımsı renkte oldukları ve kenarlarının hafif küt olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu dokuların kesit yüzünden kan sızdığı tespit edilmiştir.

Kontrol grubu karaciğer dokularında hepatositler, Remark kordonları ve hepatik sentral ven normal histolojik yapısında gözlenmiştir (Şekil 22). F15 grubu karaciğer dokularında kontrol grubu dokularında olduğu gibi hepatositler, Remark kordonları ve hepatik sentral ven'in normal histolojik yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 23, 24). F30 grubunda bazı alanlarda Remark kordonlarının düzenini kaybettiği, fokal alanlar halinde hepatositlerin sitoplazmalarında keskin sınırlı yağ vakuelleri (steatoz) ile parankimden hidropiğe varan dejeneratif değişikliklerin şekillendiği belirlenmiştir (Şekil 25). F30 karaciğerlerinde ayrıca portal venlerin ve sinüzoidal bölgelerin eritrosit birikimine bağlı genişlemiş olduğu görülmüştür (pasif hiperemi). Çoğu hayvanda özellikle perivasküler bölgelerde küçük odaklar halinde mononükleer yangısal hücre infiltrasyonu tespit edilmiştir (Şekil 26). F60 grubu karaciğer dokularında ise Remark kordonlarının düzenini kaybettiği belirlenmiştir. F30 grubuna göre diffuz dağılımlı daha büyük ve keskin sınırlı yağ vakuellerinin (steatoz) olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 27). Aynı şekilde 3. Gruba göre daha şiddetli pasif hiperemi ve özellikle perivasküler bölgelerde mononükleer yangısal hücre infiltrasyonu göze çarpmıştır (Şekil 28). Bu grupta hepatositlerde parankim ve hidropik dejenerasyonla birlikte bazı sahalarda hepatositlerde balonumsu dejenerasyon tespit edilmiştir (Şekil 27, 29). Bir kısım

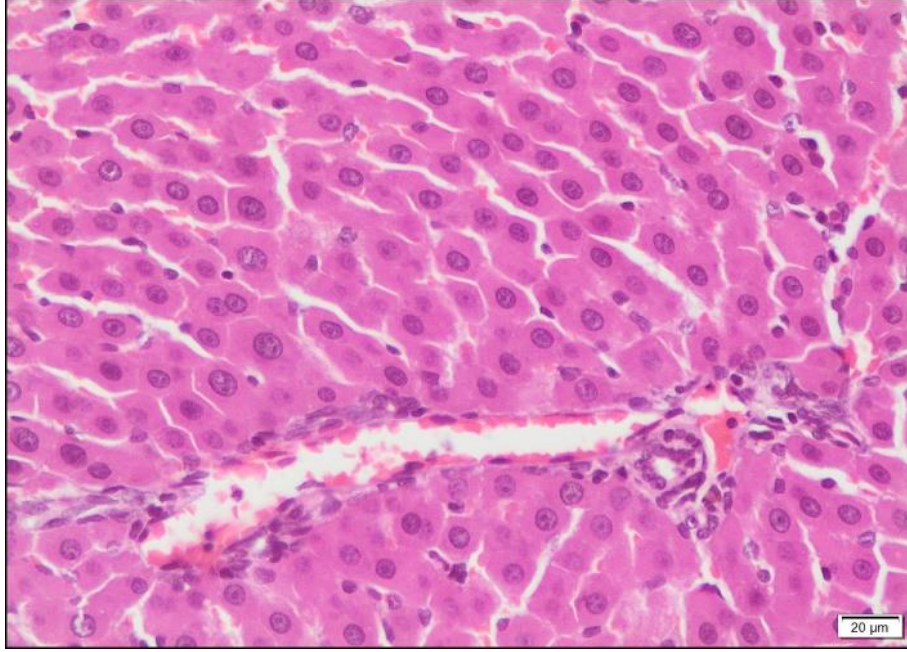
hepatositlerde nekrotik değışikliklerin yanı sıra 2 ratın karaciğerinde geniş nekroz odakları gözlenmiştir (Şekil 30).



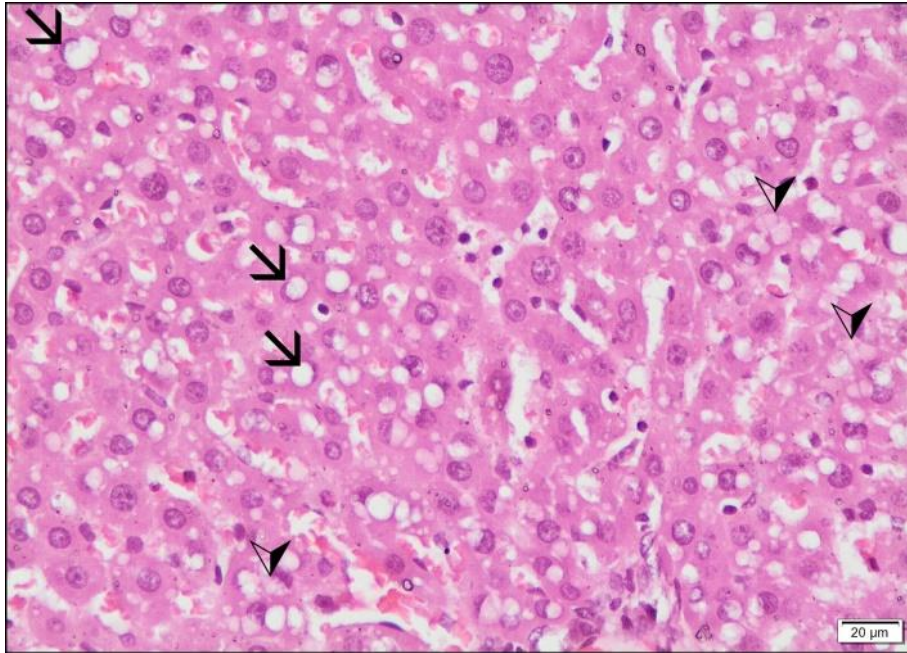
Şekil 22. Kontrol grubunda karaciğerde normal histolojik yapı, H&E.



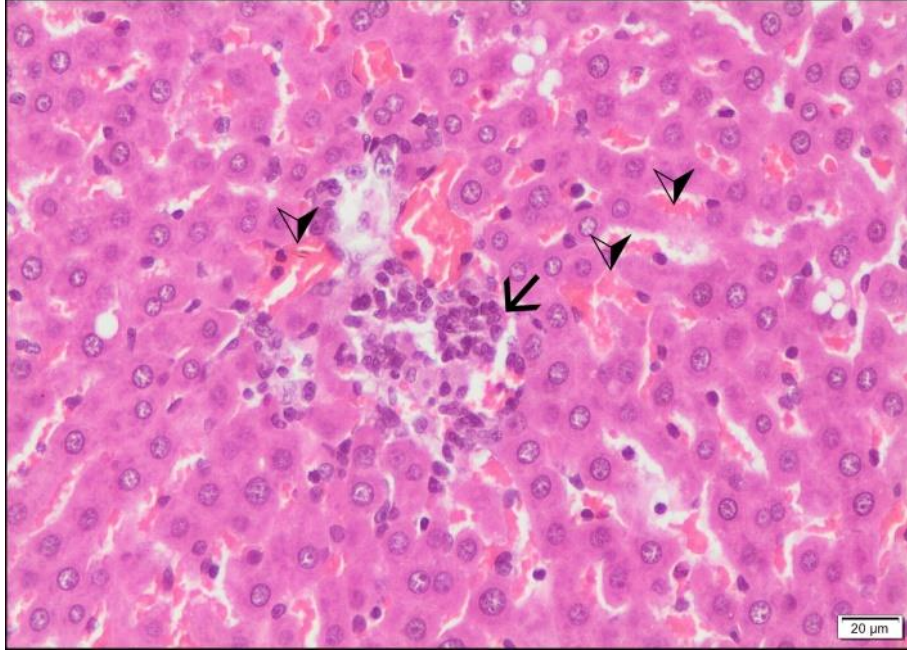
Şekil 23. F15 grubunda karaciğerde normal histolojik yapı, H&E.



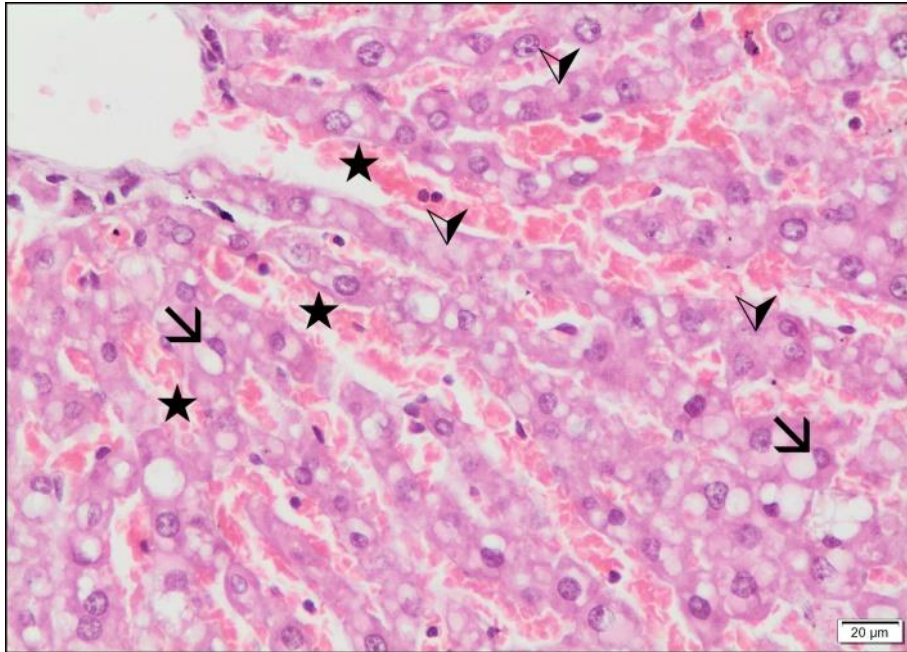
Şekil 24. F15 grubunda karaciğerde normal histolojik yapı, H&E.



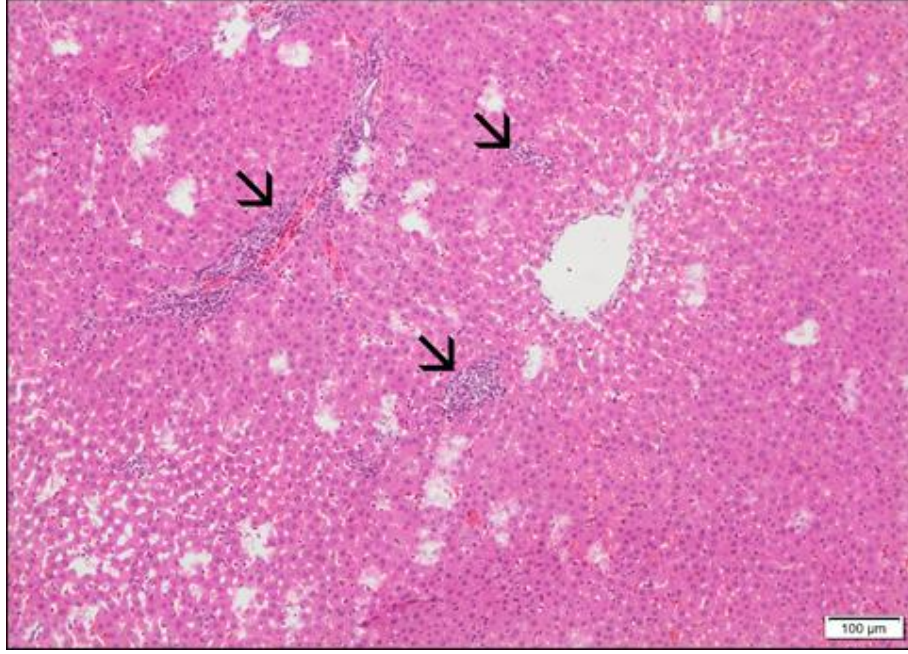
Şekil 25. F30 grubunda hepatositlerde yağ vakuolleri (oklar) ve hidropik dejenerasyon (ok başları), H&E.



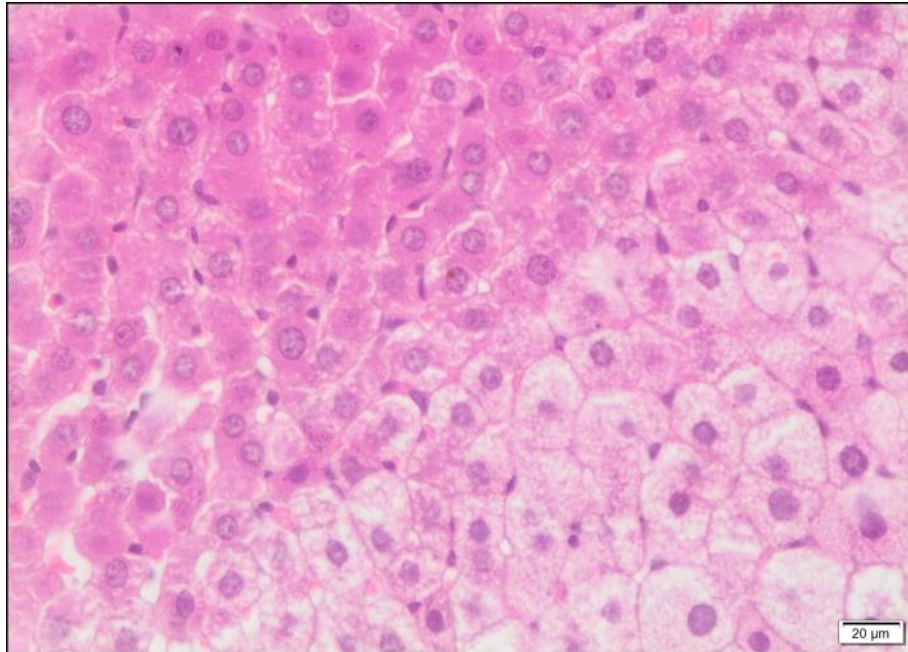
Şekil 26. F30 grubunda karaciğer dokusunda sinüzoidlerde eritrositler (ok başları) ve perivasküler yangısal hücre infiltrasyonu (ok), H&E.



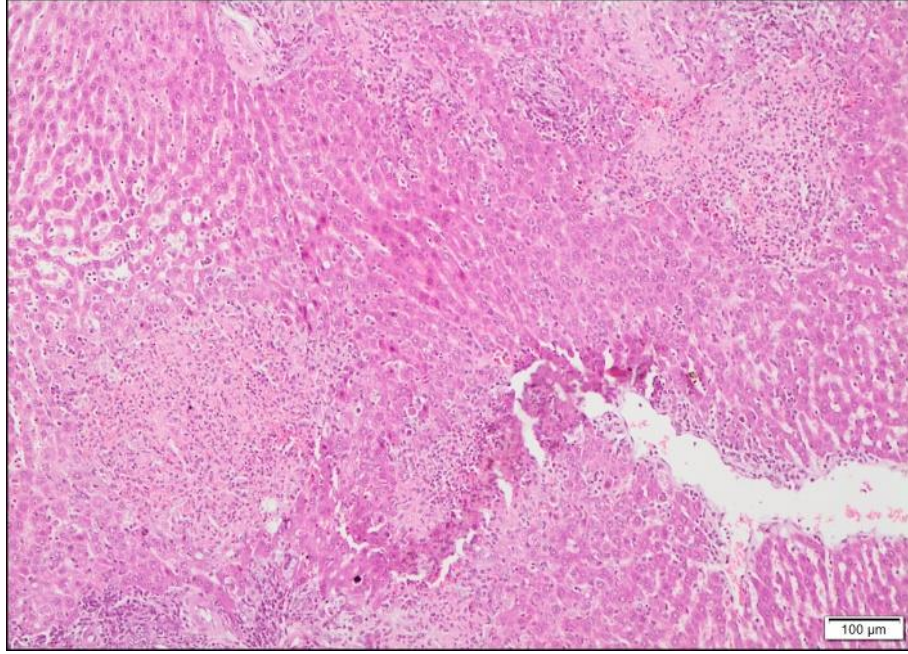
Şekil 27. F60 grubunda karaciğerde sinüzoidal boşluklarda eritrosit birikimi ile genişleme (yıldızlar), yağlanma (oklar) ve hidropik dejenerasyon (ok başları), H&E.



Şekil 28. F60 grubunda karaciğerde perivasküler yangısal hücre infiltrasyonu (oklar), H&E.



Şekil 29. F60 grubunda hepatositlerde balonumsu dejenerasyon, H&E.



Şekil 30. F60 grubunda karaciğerde geniş nekroz odakları, H&E.

Gruplardaki ratların karaciğer dokularında gözlenen yangı, pasif hiperemi, yağlanma gibi histopatolojik değişiklikler tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. Karaciğerde gözlenen histopatolojik bulgular

Histopatolojik Değişiklikler	Con	F15	F30	F60
Yangı	0	0	1	1
Pasif hiperemi	0	0	1	2
Yağlanma	0	0	1	2
Paranşimal dejenerasyon	0	0	1	1
Hidropik dejenerasyon	0	0	0	1
Balonumsu dejenerasyon	0	0	0	1
Nekroz	0	0	0	1

5. TARTIŞMA

Yaklaşık 30 yıldır yapılan çalışmalarda fruktoz tüketimiyle bağlantılı olarak obezite ve komplikasyonlarının görülme oranında artış olduğu bildirilmektedir (de Moura vd., 2009; WHO, 2019). Yapılan bu çalışmada standart yem ile birlikte farklı konsantrasyonlarda fruktoz çözeltilerinin tüketim miktarlarının konsantrasyonla orantılı olduğu belirlenmiştir. Her ne kadar diyetle alınan fruktoz insülin bağımsız metabolize edilse de çözeltideki fruktoz konsantrasyonu arttıkça tüketilen yem miktarı düşmektedir (Tablo 4). Ayrıca diyetle alınan toplam enerji miktarları da beklenildiği gibi çözeltilerdeki fruktoz konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmektedir. Ortalama yem ve çözelti tüketimi bakımından en düşük grup F60 grubu olmuştur. F60 grubunun tükettiği %60'lık fruktoz çözeltisi ml'deki enerji miktarına bağlı olarak daha az tüketilmekte bununla birlikte yem tüketimi baskılanmaktadır. Çalışma sonunda F15 ve F60 gruplarının vücut ağırlık ortalamaları kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. Yeme ilaveten %10 ve %60'lık fruktoz çözeltileriyle beslenen erişkin ratlarla yapılan bir çalışmada hem %10 hem de %60 fruktoz çözeltileriyle beslenen grupların vücut ağırlığı bakımından çalışmamızdaki F15 ve F60 gruplarına benzer şekilde kontrol grubuna göre önemli bir değişikliğe sebep olmadığı bildirilmiştir (de Moura vd., 2009). Çalışmadaki F15 grubu ortalama metabolik enerji alımı bakımından en yüksek grup olsa da vücut ağırlık ortalaması bakımından diğer gruplarla benzer bulunmuştur. F60 grubu vücut ağırlıkları ise F30'dan önemli oranda düşükken diğer gruplarla benzer bulunmuştur. Elde edilen veriler daha önce yaklaşık 10 haftalık besleme periyodu ile ratlarda yaptığımız çalışmada olduğu gibi %30'luk fruktoz çözeltisinin önemli düzeyde vücut ağırlığı artışına sebep olduğunu göstermektedir (Ozkan ve Yakan, 2019).

Yapılan bir çalışmada %20'lik fruktoz çözeltisinin hem vücut ağırlığı ortalamaları bakımından hem de lipogenez ile ilişkili biyokimyasal parametreler bakımından önemli bir değişiklik meydana getirmediği bildirilmiştir (Batista vd., 2019). Bu çalışmada, F15 ve F60 gruplarında vücut ağırlığı ortalamalarının benzerliğinin yanı sıra karaciğer ağırlıkları da benzer bulunmuştur. Bununla birlikte karaciğer ağırlığı en yüksek grubun F30 grubu olduğu tespit edilmiştir. Plazmadaki biyokimyasal parametreler bakımından yapılan analizlerde, yapılan bazı çalışmalara benzer şekilde glikoz, insülin, HDL ve total kolesterol değerleri gruplar arasında benzer bulunmuştur (Jegatheesan vd., 2015, Ozkan ve Yakan, 2019). Ancak LDL seviyeleri Kontrol, F15 ve F30 gruplarında benzer bulunmuş, en yüksek değerin ise F60 grubunda olduğu görülmüştür ($P<0,01$). Yüksek LDL, kalp damar sağlığı ve metabolik bozuklukların tetiklemekle karakterizedir. Yüksek konsantrasyondaki fruktoz çözeltisi her ne kadar vücut ağırlığı ve diğer parametrelerde önemli bir değişikliğe sebep olmasa da, LDL'yi yükseltmekte bu da metabolik bozuklukların şekillenmesine sebep

olmaktadır (Jegatheesan vd., 2015). Trigliserit seviyeleri bakımından fruktoz tüketen grupların tamamında (F15, F30 ve F60) hipertrigliseridemi tablosu şekillenmiştir. Fruktozun tüketim miktarı düşük dahi olsa yapılan çalışmalarla uyumlu olarak bu karbonhidratın hipertrigliseridemik etkili olduğu tespit edilmiştir (de Moura vd., 2009). En yüksek plazma glikoz seviyesi F60 grubunda bulunmuştur. Plazma insülin seviyeleri ise gruplar arasında benzerdir. Her ne kadar plazma glikoz seviyeleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde fark bulunmasa da bu duruma temel sebep olarak F60 grubundaki standart hatanın yüksek olması düşünülmüştür. Elde edilen bulgular insülin bağımsız metabolize olan fruktozun hiperglisemik etki gösterebilmesi için hazırlanan çözeltideki yüzdesinin önemli bir faktör olabileceğini göstermektedir.

Yüksek fruktoz tüketimiyle birlikte karaciğer ve metabolizmayla ilgili diğer dokularda kronik inflamasyon ve endotelyal disfonksiyon gelişebileceği bildirilmektedir (Zhang vd., 2017). Karaciğerde inflamasyon yolağında görevli TNF α 'nın F30 ve F60 gruplarında yaklaşık 4 kat upregüle olduğu belirlenmiştir. TNF α , inflamasyon, yara iyileşmesi ve onarımı, apoptoz gibi immun sistemle ilişkili biyolojik olaylarda öncelikli göreve sahip bir sitokindir. Karaciğerde TNF α gen ekspresyonundaki artışın trigliserit üretimi ve statoz üretimini tektiklediği ve insülin direnci gelişimini uyarabileceği bildirilmektedir (Feldstein vd., 2004). Yapılan bir çalışmada normal yeme ek olarak 4 hafta boyunca %60 fruktozlu çözeltiyle ad libitum beslenen ratlarda karaciğer TNF α gen ekspresyon seviyelerinin yaklaşık 2 kat arttığı bildirilmiştir (Vasiljević vd., 2014). Çalışmamızda bu gendeki aktivitenin biyokimyasal parametreler ve histopatolojik bulgularla uyumlu olduğu görülmüştür (Tablo 5, Tablo 7). NAFLD ile TNF α 'nın ekspresyon düzeylerinde artış olduğu bildirilse de bu çalışmada tüketime sunulan farklı konsantrasyonlardaki fruktoz çözeltilerinin etkileri karşılaştırmalı incelenmiş ve %30 ve üzeri konsantrasyondaki fruktozun TNF α gen ekspresyon seviyelerini upregüle edebileceği görülmüştür (Kanuri vd., 2011, Feldstein vd., 2004). TNF α 'ya benzer şekilde IL-1 β ve IL-6 gen ekspresyon seviyeleri F30 ve F60 grubunda upregüle olmuştur. IL-1 β , hücre proliferasyonu ve apoptozis gibi hücreyel olaylarda aktivite gösteren ve doku hasar göstergesi olarak gen ve protein düzeyinde takip edilebilen bir sitokindir. Fruktoz üzerine yapılan bir çalışmada normal beslenen ratlara göre ekspresyon seviyesinin 3 kat arttığı bildirilmiştir (Castro vd., 2015). IL-1 β yaklaşık 3 katlık bir artışla en fazla F60 grubunda aktivite göstermiştir. IL-6, genellikle TNF α ve IL-1 β ile birlikte regüle olan, inflamasyon, immun yanıt and hematopoezis'te önemli görevler alan bir sitokindir. İnflamasyona bağlı olarak mRNA ekspresyonu artan bu sitokinin, trigliserit sekresyonunun regülasyonunda da rol aldığı bildirilmektedir (Berköz and Yalın, 2008). Fruktozla beslenen gruplarda plazma trigliserit seviyeleri ve bu sitokinin gen düzeyindeki ekspresyon seviyeleri bu bilgiyi doğrular niteliktedir (Tablo 5, Tablo 6). F30 ve F60 gruplarında karaciğerde TNF α , IL-1 β ve IL-6

sitokinlerinin gen ekspresyon düzeyleri, histopatolojik olarak tespit edilen karaciğerdeki kronik inflamasyon bulgularını doğrulamaktadır (Şekil 26-28).

Karbonhidrat ve lipid metabolizmasında rol alan ve lipogenez ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyen, enerji metabolizmasının anahtar transkripsiyon faktörleri SREBP-1c ve ChREBP'in gen ekspresyon düzeyinde fruktozla beslenen grupların tamamında upregüle olduğu tespit edilmiştir (Xu vd., 2013). SREBP-1c'nin, ChREBP ve LXR α tarafından da regüle edildiği bildirilmektedir (Cha ve Repa, 2007). SREBP-1c, F15 ve F30 gruplarında yaklaşık 2 kat artış göstermekle birlikte en çok F60 grubunda upregüle olmuştur ($P<0.01$). Bununla birlikte ChREBP gen ekspresyonu deneme gruplarının tamamında yaklaşık 3 kat upregüle olmuştur. SREBP-1c'nin her ne kadar ChREBP ve LXR α 'nın aktivasyonundan etkilendiği bildirilse de bu artışın fruktoz tüketimine bağlı olarak farklı transkripsiyon faktörlerinden etkinleşmiş olabileceği düşünülmektedir (Cha ve Repa, 2007). Karaciğerde lipid biyosentezinde görevli olduğu bildirilen LXR α , trigliserit miktarını düzenler (Kamei vd., 2008, Matsusue vd., 2014). İnsülin miktarına bağlı olarak aktivitesi değişen LXR α , F15 grubunda yaklaşık 2 kat artış gösterse de diğer deneme gruplarındaki ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna benzer bulunmuştur. Bu duruma sebep olarak temel rasyondaki karbonhidratların insülin salınımını etkilemesi sonucu şekillenmiş olabileceği düşünülmüştür.

Yapılan bir çalışmada, 8 hafta boyunca %60 fruktozla beslenen Sprague Dawley ratlarda vücut ağırlığının normal beslenen hayvanlara göre daha düşük olduğu bununla birlikte çalışmamızdaki F60 grubuna benzer şekilde plazma trigliserit ve LDL seviyelerinin önemli düzeyde yüksek olduğu bildirilmiştir (Jegatheesan vd., 2015). Aynı çalışmada vücut ağırlık ortalamalarının kontrole göre düşük olmasına rağmen karaciğer dokusunda lipogenezde anahtar öneme sahip SREBP-1c ve ChREBP gen ekspresyon seviyelerinin yaklaşık 5 kat arttığı bildirilmiştir (Jegatheesan vd., 2015).

Lipogenezde görevli FAS, ACC ve SCD-1 genleri deneme gruplarının tamamında değişen önem düzeylerinde upregüle olmuştur. Yapılan bir çalışmada, çalışmamızdaki bulgulara benzer şekilde 4 hafta boyunca %60 fruktozlu rasyonla beslenen ratlarda canlı ağırlıkta önemli bir değişim meydana gelmeden FAS, ACC, SREBP-1c ve ChREBP gen ekspresyon seviyelerinde artış olduğu, bu durumun trigliserit miktarını artırdığı bildirilmiştir (Janevski vd., 2012). Karaciğerde fruktozun lipogenik etkisi SREBP-1c ve ChREBP transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra bu genlerdeki aktiviteye bağlı olarak görülmektedir. Lipogenez sürecinde yağ asidi üretimi, ACC aracılı FAS kataliziyle şekillenmektedir. FAS geni bakımından knockout farelerde yapılan bir çalışmada yağ asidi sentezinde bozukluklar meydana geldiği bildirilmiştir (Chakravarthy vd., 2005). İnsanlarda yapılan bir çalışma ile

yağlı karaciğer bozukluğuna sahip insanların 2-3 kat daha fazla fruktoz tükettiği, bu insanların FAS gen ekspresyon düzeylerinde önemli oranda artış meydana geldiği tespit edilmiştir (Ouyang vd., 2008).

Diyetle alınan fruktozun %70'ten fazlası portal ven aracılığıyla de novo lipogenezin büyük oranda gerçekleştiği karaciğere gelerek burada metabolize edilmektedir. Hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda fazla miktarda tüketilen fruktozun karaciğerde ACC aktivitesini önemli oranda etkilediği ve lipogenezin önemli oranda bu gendeki aktiviteye bağlı olarak şekillendiği ortaya konulmuştur (Koo vd., 2008, Hirahatake vd., 2011). F15 grubunda 4 kat artış gösteren bu gen F30 ve F60 gruplarında benzer oranlarda ve değişen önem düzeylerinde artış göstermiştir (Tablo 6). Yapılan bir çalışmada 10 haftalık besleme periyodu süresince standart yem ve fruktoz ile yüksek yağlı diyet ve fruktoz karşılaştırılmış ve ACC gen ekspresyonunun standart yem ile tüketime sunulan fruktozla birlikte 3 kattan fazla upregüle olduğu bildirilmiştir (Softic vd., 2017). Hiperlipidemik etkili fruktoz lipogenez yolağında ACC'yi diğer enerji kaynaklarına göre daha fazla tetiklemektedir. Yaptığımız çalışmaya göre düşük konsantrasyondaki fruktoz çözeltisi bu genin aktivitesini daha fazla etkilediği görülse de karaciğerdeki lipogenik aktivitenin en fazla F30 ve F60 gruplarında olduğu anlaşılmıştır.

Fruktoz tüketiminin karaciğerde SCD-1 gen ekspresyonunda önemli düzeyde upregülasyona neden olduğu grupların tamamında görülmektedir (Tablo 6). SCD-1, lipid ve karbonhidrat metabolizmasında merkezi role sahip olup, trigliserit ve diğer lipidlerin sentezi için gereklidir (Miyazaki vd., 2004). SREBP-1c bağımlı ve bağımsız yollarda diyetteki fruktozla birlikte lipogenezin şekillenebilmesi için SCD-1 geninin gerekli olduğu, SCD-1'in enerji tüketimini ve insülin hassasiyetini artırdığı ve bu gendeki aktivitenin karaciğer steatozu ile sıkı bir ilişki içerisinde olduğu bildirilmektedir (Cohen vd., 2002, Ntambi ve Miyazaki, 2003, Miyazaki vd., 2004). SREBP-1c'nin SCD-1 ile sıkı bir ilişkisi olduğu yaptığımız çalışma sonuçlarıyla anlaşılmaktadır. SCD-1 gen ekspresyon seviyesi 10 kattan fazla artarak en fazla F60 grubunda upregüle olmuştur. Bu durum histopatolojik olarak da tespit edilen karaciğerdeki steatozu doğrular niteliktedir.

Histopatolojik incelemelere göre her ne kadar en şiddetli değişiklik F60 grubunda olsa da F30 grubu karaciğerlerinin de fruktoz tüketimine bağlı olarak zarar gördüğü belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada %70'lik fruktoz diyetinin Wistar ratlarda karaciğerde şiddetli makroveziküler steatoza ve intralobular inflamasyona neden olduğu bildirilmiştir (Takahashi vd., 2012). Karaciğerde aşırı yağ depolanması karaciğer hassasiyetini artırmakta ve hasar verici etkenlere karşı daha duyarlı hale getirmektedir. Bu durum fibrozis ve hepatosteozis gelişimine neden olmaktadır (Ayala vd., 2014). F30 ve F60 gruplarında

lipogenik gen ekspresyonu bulgularının yanı sıra elde edilen histopatolojik sonuçlar yağlanmaya bağlı olarak karaciğerde hasar oluştuğunu göstermektedir. Gen ekspresyon sonuçları, F30 ve F60 gruplarındaki hasarı doğrular niteliktedir. Bununla birlikte F15 çözeltileriyle beslenen hayvanların karaciğer histopatolojisi bakımından kontrol grubuna benzer oldukları tespit edilmiştir. Sekiz hafta boyunca %15'lik fruktoz çözeltisiyle beslenmenin her ne kadar plazma trigliserit seviyelerini yükselttiği belirlenmiş olsa da karaciğerde önemli bir patolojik değişikliğe yol açmadığı anlaşılmıştır. İnflamasyon, yağlanma ve pasif hiperemi bakımından F60 grubu rat karaciğerlerinin en yüksek değerlere sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 27-30). Dejeneratif ve nekrotik değişiklikler bakımından en hasarlı grubun F60 grubu olduğu tespit edilmiştir. Benzer konsantrasyonlarda fruktoz çözeltilerinin (%30'luk fruktoz çözeltisi) kullanımıyla farelerde yapılan benzer çalışmalarda elde edilen histopatolojik, biyokimyasal bulgular bu çalışmadan elde edilen bulgularla benzerdir (Ouyang vd., 2008; Chen vd., 2016; Ozkan ve Yakan 2019).

6. SONUÇ

Yapılan bu çalışmayla farklı dozlarda fruktoz tüketiminin biyokimyasal parametrelerin yanı sıra karaciğerdeki moleküler aktiviteyi farklı düzeylerde değiştirdiği ve histopatolojik değişikliklerin en fazla yüksek konsantrasyondaki fruktoz çözeltisinin (%60'lık fruktoz çözeltisi) tüketimiyle şekillendiği anlaşılmıştır. Ayrıca çalışmadan elde edilen bulgular, metabolizma ile ilgili çalışmalarda ratlarda yağlanma, karaciğer hasarı gibi parametreler için yüksek fruktoz kullanımıyla deneme modeli kurulabileceğini göstermiştir. Fruktoz tüketimiyle metabolizmadaki değişikliklere bağlı olarak organizmada meydana getirdiği değişiklikler üzerine araştırmalar devam etmektedir. Değişen oranlarda diyetle giren fruktozun, tüketim miktarının yanı sıra uzun süreli tüketim gibi süreye bağlı olarak da metabolik aktiviteyi değiştirebileceği düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda fruktozun karaciğerdeki lipogenik etkisinin yanı sıra, farklı organlarda lipogenezde görevli genlerin etkinliği ile ilgili çalışmalar olduğu görülmektedir. Bununla birlikte önemli bir karbonhidrat kaynağı olan ve yüksek fruktozlu mısır şurubu gibi kaynaklarla günlük diyetle sıklıkla giren fruktozun metabolik etkileri ile ilgili moleküler düzeyde daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. 2014. "Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal", *Oxid Med Cell Longev*, 1-31.
- Batista, L. O., Ramos, V. W., Rosas Fernández, M. A., Concha Vilca C. M., Albuquerque K.T. D. 2019. "Oral solution of fructose promotes SREBP-1c high-expression in the hypothalamus of Wistar rats", *Nutritional Neuroscience*, 22(9), 648-654.
- Berköz, M., Yalın, S. 2008. "Yağ dokusunun immünolojik ve inflamatuvar fonksiyonları", *Mersin Univ Sağlık Bilim Dergisi*, 1, 1–9.
- Castro, M. C., Massa, M. L., Arbeláez, L. G., Schinella, G., Gagliardino, J. J., Francini, F. 2015. "Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid", *Life Science*, 137:1-6.
- Cha, J.Y., Repa, J. J., 2007. "The Liver X Receptor (LXR) and hepatic lipogenesis: The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR", *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 743-751.
- Chakravarthy, M. V., Pan, Z., Zhu, Y., Tordjman, K., Schneider, J. G., Coleman, T., Turk, J., Semenkovich, C.F. 2005. "New" hepatic fat activates PPAR α to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis", *Cell metabolism*, 1(5):309-322.
- Chen, H. L., Tsai, T. C., Tsai, Y. C., Liao, J. W., Yen, C. C., Chen, C. M. 2016. "Kefir peptides prevent high-fructose corn syrup-induced non-alcoholic fatty liver disease in a murine model by modulation of inflammation and the JAK2 signaling pathway", *Nutrition & diabetes*, 6(12), e237-e237.
- Cohen, P., Miyazaki, M., Socci, N. D., Hagge-Greenberg, A., Liedtke, W., Soukas A. A, Sharma R, Hudgins, L. C., Ntambi, J. M., Friedman, J. M. 2002. "Role for stearyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss", *Science*, 297(5579), 240-243.
- Contreras, A. V., Torres, N., Tovar, A. R. 2013. "PPAR- α as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation", *Advances in Nutrition*, 4(4), 439-452.
- de Moura, R. F., Ribeiro, C., de Oliveira, J. A., Stevanato, E., de Mello, M.A.R. 2009. "Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols", *British Journal of Nutrition*, 101(8), 1178-1184.
- dos Santos, B. P., da Costa Diesel, L. F., da Silva Meirelles, L., Nardi, N. B., Camassola, M. 2016. "Identification of Suitable Reference Genes for Quantitative Gene Expression Analysis in Rat Adipose Stromal Cells Induced to Trilineage Differentiation", *Gene*, 594(2), 211-219.
- Duarte, J. A., Carvalho, F., Pearson, M., Horton, J. D., Browning, J. D., Jones, J. G., Burgess, S. C. 2014. "A High-fat Diet Suppresses De novo Lipogenesis and Desaturation

but not Elongation and Triglyceride Synthesis in Mice”, *Journal of Lipid Research*, 55(12), 2541-2553.

- Elliott, S. S., Keim, N. L., Stern, J. S., Teff, K., Havel, P.J. 2002. “Fructose, Weight Gain, and the Insulin Resistance Syndrome”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(5), 911-922.
- Erion, D. M., Popov, V., Hsiao, J. J., Vatner, D., Mitchell, K., Yonemitsu, S., Murray, S. F. 2013. “The role of the carbohydrate response element-binding protein in male fructose-fed rats”, *Endocrinology*, 154(1), 36-44.
- Feldstein, A. E., Werneburg, N. W., Canbay, A., Guicciardi, M. E, Bronk, S. F., Rydzewski, R., Burgart, L. J., Gores, G. J. 2004. “Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway”, *Hepatology*, 40(1), 185-194.
- Fernández-Hernando, C., Suárez, Y., Rayner, K. J., Moore, K. J. 2011. “MicroRNAs in lipid metabolism”, *Current opinion in Lipidology*, 22(2), 86.
- Filhoulaud, G., Guilmeau, S., Dentin, R., Girard, J., Postic, C. 2013. “Novel insights into ChREBP regulation and function”, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(5), 257-268.
- Ge, Q., Huang, N., Wynn, R. M., Li, Y., Du, X., Miller, B., Uyeda, K. 2012. “Structural characterization of a unique interface between carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) and 14-3-3 β protein.” *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 41914-41921.
- Geidl-Flueck, B., Gerber, P. A. 2017. “Insights into the hexose liver metabolism—glucose versus fructose”, *Nutrients*, 9(9), 1-21.
- Gou, S. H., Huang, H. F., Chen, X. Y., Liu, J., He M., Ma, Y. Y., Zhao, X. N, Zhang, Y., Ni, J. M. 2016. “Lipid-lowering, hepatoprotective, and atheroprotective effects of the mixture Hong-Qu and gypenosides in hyperlipidemia with NAFLD rats”, *Journal of Chinese Medical Association*. 79(3), 111-121.
- Grønning-Wang, L. M., Bindesbøll, C., Nebb, H. I. 2013. The role of liver X receptor in hepatic de novo lipogenesis and cross-talk with insulin and glucose signaling. In *Lipid Metabolism*. Editör: Baez, R. V. InTech.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., Çavuşoğlu, H., Yeğen, B.Ç. 2007. *Tıbbi Fizyoloji* (11th ed). Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, İstanbul.
- Hanover, L. M., White, J. S. 1993. “Manufacturing, Composition, and Applications of Fructose”, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58(5), 724-732.
- He, Z., Jiang, T., Wang, Z., Levi, M., Li, J. 2004. “Modulation of Carbohydrate Response Element-binding Protein Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes and Rat Adipose

Tissue”, American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 287(3), 424-430.

- Hirahatake, K. M., Meissen, J. K., Fiehn, O., Adams, S. H. 2011. “Comparative effects of fructose and glucose on lipogenic gene expression and intermediary metabolism in HepG2 liver cells”, PloS One, 6(11), 1-9.
- Hirako, S., Wakayama, Y., Kim, H., Iizuka, Y., Matsumoto, A., Wada, N., Kimura, A., Okabe, M., Sakagami, J., Suzuki, M., Takenoya, F. 2015. The Relationship between Aquaglyceroporin Expression and Development of Fatty Liver in Diet-Induced Obesity and ob/ob Mice”, Obesity Research & Clinical Practice, 1, 1-9.
- Iizuka, K. 2013. “Recent progress on the role of ChREBP in glucose and lipid metabolism.” Endocrine Journal, 60(5), 543-555.
- Ikemoto, S., Takahashi, M., Tsunoda, N., Maruyama, K., Itakura, H., Ezaki, O. 1996. “High-fat Diet-induced Hyperglycemia and Obesity in Mice: Differential Effects of Dietary Oils”, Metabolism, 45(12), 1539-1546.
- Janevski, M., Ratnayake, S., Siljanovski, S., McGlynn, M. A., Cameron-Smith, D., Lewandowski, P. 2012. “Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat”, Food & Function, 3(2), 141-149.
- Jegatheesan, P., Beutheu, S., Ventura, G., Nubret, E., Sarfati, G., Bergheim, I., De Bandt, J. P. 2015. “Citrulline and nonessential amino acids prevent fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in rats”, The Journal of Nutrition, 145(10), 2273-2279.
- Johnson, R. J., Segal, M. S., Sautin, Y., Nakagawa, T., Feig, D. I., Kang, D. H., Gersch, M. S., Benner, S., Sánchez-Lozada, L. G. 2007. “Potential Role of Sugar (fructose) in the Epidemic of Hypertension, Obesity and the Metabolic Syndrome, Diabetes, Kidney Disease, and Cardiovascular Disease”, The American Journal of Clinical Nutrition, 86(4), 899-906.
- Joseph, S. B., Laffitte, B. A., Patel, P. H., Watson, M. A., Matsukuma, K. E., Walczak, R., Collins, J. L., Osborne, T. F., Tontonoz, P. 2002. “Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors”, Journal of Biological Chemistry, 277(13), 11019-11025.
- Kamei, Y., Miura, S., Suganami, T., Akaike, F., Kanai, S., Sugita, S., Katsumata, A., Aburatani, H., Unterman, T. G., Ezaki, O. 2008. “Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: role of retinoid X receptor/liver X receptor and forkhead-O1 transcription factor”, Endocrinology, 149(5), 2293-2305.
- Kanuri, G., Spruss, A., Wagnerberger, S., Bischoff, S. C., Bergheim, I. 2011. “Role of tumor necrosis factor α (TNF α) in the onset of fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice”, The Journal Nutritional Biochemistry, 22(6), 527-534.

- Khan, H., Abdelhalim, M., Alhomida, A., Al Ayed, M. 2013. "Transient increase in IL-1 β , IL-6 and TNF- α gene expression in rat liver exposed to gold nanoparticles", Genetic and Molecular Research, 12(4), 5851- 5857.
- Kim, S., Sohn, I., Ahn, J. I., Lee, K. H., Lee, Y. S., Lee, Y. S. 2004. "Hepatic gene expression profiles in a long-term high-fat diet-induced obesity mouse model", Gene, 340(1), 99-109.
- Kogelman, L. J., Zhernakova, D. V., Westra, H. J., Cirera, S., Fredholm, M., Franke L., Kadarmideen, H. N. 2015. "An Integrative Systems Genetics Approach Reveals Potential Causal Genes And Pathways Related to Obesity", Genome Medicine, 7(1), 1-15.
- Koo, H. Y., Wallig, M. A., Chung, B. H., Nara, T. Y., Cho, B. H. S., Nakamura, M. T. 2008. "Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1782(5), 341-348.
- Korkmaz A. 2008. "Fructose; A Hidden Threat for Chronic Diseases", TAF Preventive Medicine Bulletin, 7(4), 343-346.
- Küçükkaya, B. Hiperlipidemik Hastalarda Ezetemib Monoterapisinin Lipid Profili İle Enflamatuvar Belirteçlerin Üzerindeki Etkileri. Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı, İstanbul Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, İstanbul, 2008.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method", Methods, 25(4), 402-408.
- Lizuka, K., Bruick, R. K., Liang, G., Horton, J. D., Uyeda, K. 2004. "Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(19), 7281-7286.
- Loeffelholz, C., Lieske, S., Neuschäfer-Rube, F., Willmes, D. M., Raschzok, N., Sauer, I. M., ... Pathe-Neuschäfer-Rube, A. König, J., Fromm, M. F., Horn, P., Chatzigeorgiou, A., Pathe-Neuschäfer-Rube, A., Jordan J., Pfeiffer, A. F.H., Mingrone, G., Bornstein, S. R., Stroehle, P., Harms, C., Wunderlich, F. T., Helfand, S. L., Bernier, M., de Cabo, R., Shulman, G. I., Chavakis, T., Püschel, G. P., Birkenfeld, A. L. 2017. "The human longevity gene homolog INDY and interleukin-6 interact in hepatic lipid metabolism." Hepatology, 66(2), 616-630.
- Lozano, I., Van der Werf, R., Bietiger, W., Seyfritz, E., Peronet, C., Pinget, M., Jeandidier N., Maillard, E., E., Marchioni, Sigrist, S., Dal, S. 2016. "High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: Impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications", Nutrition Metabolism, 13(1), 1-13.

- Luna, L. G. 1968. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 32-241. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Matsusue, K., Aibara, D., Hayafuchi, R., Matsuo, K., Takiguchi, S., Gonzalez, F. J., Yamano, S. 2014. "Hepatic PPAR γ and LXR α independently regulate lipid accumulation in the livers of genetically obese mice", FEBS Letters, 588(14), 2277-2281.
- Miyazaki, M., Dobrzyn, A., Man, W. C., Chu, K., Sampath, H., Kim, H. J., Ntambi, J. M. 2004. "Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and-independent mechanisms." Journal of Biological Chemistry, 279(24), 25164- 25171.
- Mock, K., Lateef, S., Benedito, V. A., Tou, J. C. 2017. "High-Fructose Corn Syrup-55 Consumption Alters Hepatic Lipid Metabolism and Promotes Triglyceride Accumulation", The Journal of Nutritional Biochemistry, 39, 32-39.
- Mohammadi, E., Ghaedi, K., Esmailie, A., Rahgozar, S. 2013. "Gene expression profiling of liver X receptor α and Bcl-2-associated X protein in experimental transection spinal cord-injured rats", The Journal of Spinal Cord Medicine, 36(1), 66-71.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W., 2004. Sayfa 160-307. Harper Biyokimya. Editör: Dikmen, N., Özgönen, T. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Nakamura, M. T., Yudell, B. E., Loor, J. J. 2014. "Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids", Progress in Lipid Research, 53, 124-144.
- Nishikata, N., Shikata, N., Kimura, Y., Noguchi, Y. 2011. "Dietary Lipid-dependent Regulation of de novo Lipogenesis and Lipid Partitioning by Ketogenic Essential Amino Acids in Mice", Nutrition & Diabetes, 1(3), 1-12.
- Ntambi, J. M., Miyazaki, M. 2003. "Recent insights into stearoyl-CoA desaturase-1", Current Opinion in Lipidology, 14(3), 255-261.
- Ode, K. L., Frohnert, B. I., Nathan, B. M. 2009. "Identification and treatment of metabolic complications in pediatric obesity", Reviews Endocrine Metabolic Disorders, 10(3), 167-188.
- Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin Y., McCall, S., Bruchette, J. L., Diehl, A. M., Johnson, R. J., Abdelmalek, M. F. 2008. "Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease", Journal of Hepatology, 48(6), 993-999.
- Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchette, J. L., Diehl, A. M., Johnson, R. J., Abdelmalek, M. F. 2008. "Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease", Journal of Hepatology, 48(6), 993-999.
- Ozkan, H., Yakan, A. 2019. "Dietary high calories from sunflower oil, sucrose and fructose sources alters lipogenic genes expression levels in liver and skeletal muscle in rats", Annals of Hepatology, 18(5), 715-724.

- Pang, J., Xi, C., Huang, X., Cui, J., Gong, H., Zhang T. 2016. "Effects of Excess Energy Intake on Glucose and Lipid Metabolism in C57BL/6 Mice", *PloS One*, 11(1), 1-12.
- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., Nilsen, T.W. 2010. Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). CSH press. (6):1-3.
- Sanders, F. W., Griffin, J. L. 2016. "De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose", *Biological Reviews*, 91(2), 452-468.
- Sangesa, G., Montas, J. C., Baena, M., Snchez, R. M., Roglans, N., Alegret, M., Laguna, J. C. 2019. "Chronic fructose intake does not induce liver steatosis and inflammation in female Sprague–Dawley rats, but causes hypertriglyceridemia related to decreased VLDL receptor expression", *European Journal of Nutrition*, 58(3), 1283-1297.
- Softic, S., Cohen, D. E., Kahn, C. R. 2016. "Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease", *Digestive Disease Sciences*, 61(5), 1282-1293.
- Softic, S., Gupta, M. K., Wang, G. X., Fujisaka, S., O'Neill, B. T., Rao, T. N., Willoughby, J., Harbison, C., Fitzgerald, K., Ilkayeva, O. 2017. "Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling", *The Journal of Clinical Investigation*, 127(11), 4059-4074.
- Stanhope, K. L., Havel, P. J. 2008. "Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose, or high fructose corn syrup", *The American Journal Clinical Nutrition*, 88(6), 1733-1737.
- Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T. 2014. "IL-6 in inflammation, immunity, and disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), 1-16.
- Tappy, L., Le, K.A. 2010. "Metabolic Effects of Fructose and the Worldwide Increase in Obesity", *Physiological Reviews*, 90(1), 23-46.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. "Accurate Normalization of Real-time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes", *Genome Biology*, 3(7), 1-12.
- Vasiljević, A., Bursać, B., Djordjevic, A., Milutinović, D. V., Nikolić, M., Matić, G., Veličković, N. 2014. "Hepatic inflammation induced by high-fructose diet is associated with altered 11 β HSD1 expression in the liver of Wistar rats", *European Journal Nutrition*, 53(6), 1393-1402.
- Vidal-Alabro, A., Méndez-Lucas, A., Semakova, J., Gómez-Valadés, A. G, Perales, J. C. 2012. Liver Glucokinase and Lipid Metabolism. Dyslipidemia-From Prevention to Treatment. Editor: Kelishadi, R. InTech.
- World Health Organization (WHO). "Global Report on Diabetes". World Health Organization, France, 2016, s. 1(1): 20-74.

- World Health Organization (WHO). Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. *World Health Organization Technical Report Series*, Switzerland, 2000, s. 894: 6.
- Xu, X., So, J. S., Park, J. G., Lee, A. H. 2013. "Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP", *Seminars Liver Disease*, 33(4), 301-311.
- Yang, Z. H., Miyahara, H., Takeo, J., Katayama, M. 2012. "Diet High in Fat and Sucrose Induces Rapid Onset of Obesity-related Metabolic Syndrome Partly through Rapid Response of Genes involved in Lipogenesis, Insulin Signalling and Inflammation in Mice", *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 4(32), 1-10.
- Yasari, S., Prud'homme, D., Wang, D., Jankowski, M., Levy, É., Gutkowska, J., Lavoie, J. M. 2010. "Exercise training decreases hepatic SCD-1 gene expression and protein content in rats", *Molecular and Cell Biochemistry*, 335(1-2), 291-299.
- Zhang, D. M., Jiao, R. Q., Kong, L. D. 2017. "High dietary fructose: direct or indirect dangerous factors disturbing tissue and organ functions", *Nutrients*, 9(4), 335-360.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Dr. Öğr. Üyesi HÜSEYİN ÖZKAN
Proje No:	118O381
Proje Başlığı:	Rat Karaciğerinde Lipogenez Yolağındaki Fas, Acc, Scd-1, Chrebp, Srebp-1c, Lxr? Ve İnflamasyon Yolağındaki Tnf?, Il-1β, Il-6 Genlerinin Fruktozla Bağlı Olarak Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi
Proje Türü:	3001 - Başlangıç AR-GE
Proje Süresi:	18
Araştırmacılar:	TUNCER KUTLU, ŞULE YURDAGÜL ÖZSOY
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	HATAY MUSTAFA KEMAL Ü. VETERİNER F. GENETİK ABD.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/08/2018 - 15/02/2020
Onaylanan Bütçe:	77203.0
Harcanan Bütçe:	63540.54
Öz:	Bu çalışma farklı konsantrasyonlarda (%15, %30 ve %60) fruktoz içeren çözeltilerle beslenen ratlarda karaciğerde lipogenez ve inflamasyon yolağındaki genlerin ekspresyon seviyelerini belirlemek ve bazı biyokimyasal parametrelerle histopatolojik değişiklikleri araştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmada 32 Wistar albino erkek rat kullanılmıştır. Çalışmada K (Kontrol, normal diyet), F15 (Normal diyet+%15'lik fruktoz çözeltisi), F30 (Normal diyet+ %30'luk fruktoz çözeltisi) ve F60 (Normal diyet+%60'lık fruktoz çözeltisi) olmak üzere 4 farklı grup oluşturulmuştur (n=8). On haftalık besleme periyodu sonrası anestezi altında kalpten kan alımı ile ötenazi uygulanan ratlardan karaciğer dokuları alınarak moleküler (-80 °C'de) ve histopatolojik analizler (% 10'luk tamponlu formolde) için muhafaza edilmiştir. Alınan kanlardan plazma elde edilerek glikoz, insülin, HDL, LDL, total kolesterol ve trigliserit parametreleri belirlenmiştir. Karaciğer dokularından ise RT-qPCR teknolojisi ile FAS, ACC, SCD-1, ChREBP, SREBP-1c, LXR?, TNF?, IL-1? ve IL-6 genlerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Ayrıca fruktoz tüketimine bağlı olarak karaciğerde şekillenerek değişiklikler histopatolojik olarak incelenmiştir. Besleme periyodu sonrası vücut ağırlığı ortalamaları bakımından F30'un en ağır, F60'ın ise en hafif grup olduğu belirlenmiştir. Deneme gruplarının tamamında (F15, F30 ve F60) plazma trigliserit seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. F30 ve F60'da TNF?, IL-1? ve IL-6 upregüle olurken , SREBP-1c, ChREBP, FAS, ACC ve SCD-1'in tüm deneme gruplarında upregüle olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, F30 ve F60 gruplarındaki ratların karaciğer dokularında dejeneratif değişiklikler ve steatoz olduğu belirlenmiştir. Fruktola bağlı en fazla hasar F60 grubunda tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu fruktoz çözeltisinin tüketimi ile karaciğerde lipogenik ve inflamatuvar etkinliğe bağlı olarak önemli histopatolojik değişikliklerin olduğu görülmüştür. Elde edilen bulgular, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması vücut ağırlığında önemli bir değişiklik olmadan fruktoz tüketimiyle gelişebileceğini göstermiştir. Çözelti şeklinde tüketilen fruktozun konsantrasyonunun, normal karaciğer fizyolojisi ve vücut homeostazisinin sürdürülebilmesinde çok önemli bir faktör olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca yapılan bu projeden elde edilen bulgular, diyetle yüksek dozlarda fruktoz kullanımıyla metabolik sendrom modeli oluşturabilmenin mümkün olduğunu göstermiştir.
Anahtar Kelimeler:	Rat, Gen ekspresyonu, Fruktoz, Karaciğer
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır