T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YÜKSEK FRUKTOZ İLE BESLENEN HAYVANLARIN OMENTUM DOKUSUNDA IRS-1, IRS-2, SIRT1, mTOR, FOXO VE Nrf2 GEN EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

ARASH CHEHREHEI

FARMAKOLOJİ (ECZ.) ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2019

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

Gazi

1926

YÜKSEK FRUKTOZ İLE BESLENEN HAYVANLARIN OMENTUM DOKUSUNDA IRS-1, IRS-2, SIRT1, mTOR, FOXO VE Nrf2 GEN EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

Arash CHEHREHEI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMAKOLOJİ (ECZ.) ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMMUZ 2019

Arash CHEHREHEI tarafından hazırlanan "YÜKSEK FRUKTOZ İLE BESLENEN HAYVANLARIN OMENTUM DOKUSUNDA IRS-1, IRS-2, SIRT1, mTOR, FOXO VE Nrf2 GEN EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Fatma AKAR
Farmakoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Başkan: Prof. Dr. Mecit Orhan ULUDAĞ
Farmakoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Üye: Prof. Dr. Nuray ARI
Farmakoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~ .....

Tez Savunma Tarihi: 12/07/2019

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Arash CHEHREHEI

12/07/2019

YÜKSEK FRUKTOZ İLE BESLENEN HAYVANLARIN OMENTUM DOKUSUNDA IRS-1, IRS-2, SIRT1, mTOR, FOXO VE Nrf2 GEN EKSPRESYONLARININ İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Arash CHEHREHEI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2019

ÖZET

Yüksek fruktoz tüketiminin insülin direnci, diyabet, hiperlipdemi ve karaciğer yağlanması ile karakterize metabolik sendroma neden olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalar, fruktozun insülin etkisine aracılık eden faktörlerin duyarsızlaşmasına neden olduğu ve böylece glukoz ve lipit metabolizmasını bozduğunu, ayrıca omental adipoz dokuda kitle artışına neden olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında, fruktoz ile indüklenen metabolik sendromun adipoz dokuda moleküler düzeydeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, sıçanlara 30 hafta boyunca içme suyu içerisinde %15 fruktoz verilerek metabolik sendrom modeli oluşturulmuştur. Deney bulguları, fruktoz tüketimiyle hiperglisemi, hiperinsülinemi ve dislipidemi geliştiğini göstermektedir. Ayrıca, omental yağ kitlesinin içme suyu içinde yüksek fruktoz verilen grupta önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Omental adipoz doku homojenatlarında yapılan gen ölçümleri incelendiğinde ise; fruktoz tüketiminin *IRS-1*, *IRS-2*, *SIRT-1* ve *Foxo3a* mRNA ekspresyonlarını anlamlı derecede azalttığı, fakat *mTOR* ve *Nrf2* mRNA düzeylerinde belirgin bir değişiklik yapmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, uzun süreli yüksek fruktoz tüketiminin adipoz dokuda insülin sinyal yolağında fonksiyon bozukluğuna neden olarak omental hipertrofik obeziteye yol açabileceğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 1062.1
Anahtar Kelimeler : Fruktoz, Metabolik sendrom, İnsülin sinyal yolağı, Adipoz doku
Sayfa Adedi : 54
Danışman : Prof. Dr. Fatma AKAR

INVESTIGATION OF HIGH-FRUCTOSE DIET ON GENE EXPRESSION OF IRS-1, IRS-2, SIRT-1, mTOR, FOXO3A AND Nrf2 IN ADIPOSE TISSUE OF RATS

(M.Sc. Thesis)

Arash CHEHREHEI

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

July 2019

ABSTRACT

Fructose consumption is known to cause metabolic syndrome characterized by insulin resistance, diabetes, dislipidemia and fatty liver. Previous studies have shown that fructose disturbs glucose and lipid metabolism by causing desensitization of insulin signaling pathway; it also leads to an increase in omental adipose tissue mass. In this study, we aim to show the molecular effects of fructose-induced metabolic syndrome in adipose tissue. For this purpose, metabolic syndrome model was produced by giving 15% fructose in drinking water to rats for 30 weeks. Our findings showed that fructose consumption causes hyperglycemia, hyperinsulinemia and dyslipidemia in the rats. Moreover, omental fat mass of rats was increased due to high fructose intake. In the experiments with gene expression made in the omental adipose tissue homogenates, we found that fructose consumption significantly decreased *IRS-1*, *IRS-2*, *SIRT-1* and *Foxo3a* mRNA levels, however, did not affect *mTOR* and *Nrf2* mRNA levels. Our findings indicated that long-term high fructose consumption causes a downregulation in the insulin signaling pathway of omental adipose tissue which can be involved in the pathology of omental hypertrophic obesity.

Science Code : 1062.1

Key Words : Fructose, metabolic syndrome, insulin signaling pathway, adipose tissue

Page Number : 54

Advisor : Prof. Dr. Fatma AKAR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde bilgisi ve tecrübesiyle bana her zaman destek olan tez dönemim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen değrli danışmanım sayın Prof. Dr. Fatma AKAR'a, tezime olan değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Mehmet Bilgehan PEKTAŞ'a, katkilarindan dolayı Doç. Dr. Gökhan SADİ, laboratuvar çalışmaları sırasında desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Uzm.Ecz. Gözde ÖZTÜRK BİNGÖL, Ecz. Sümeyra USLU ve Ecz. Aylin ÇETİN' e destekleriyle bana bu imkanları sağlayan ve herzaman yanımda olan anne, baba ve ablama teşekkürü bir borç bilerim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ix

ŞEKİLLERİN LİSTESİ x

SİMGELER VE KISALTMALAR xi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Metabolik Sendrom 3

2.2. Obezite 3

2.3. İnsülin 4

2.3.1. İnsülin sinyal yolağı 5

2.3.2. İnsülin direnci 8

2.4. Fruktoz 9

2.4.1. Fruktozun absorbsiyonu 10

2.4.2. Fruktozun metabolizması 11

2.4.3. Diyet içerisinde yüksek fruktoz alımının adipoz doku üzerine etkisi 12

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 17

3.1. Hayvanlar ve Diyet 17

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler 17

3.3. Sıçanların Ağırlık, Günlük Yem, Sıvı Tüketimi ve Kalori Alımı Hesaplanması 18

3.4. Plazmada Glukoz, İnsülin ve Lipit Profilinin Düzeylerinin Belirlenmesi 18

3.5. Real Time-PCR Yöntemiyle mRNA Miktar Tayini 18

Sayfa

3.6. Kuantitatif Gerçek Zamanlı PZR (Real time-PCR) 19

3.7. İstatistiksel Analiz 20

4. BULGULAR 21

4.1. Sıçanların Ağırlıkları ile Günlük Yem, Sıvı ve Kalori Tüketimi 21

4.2. Sıçanların Plazma Glukoz ve İnsülin Düzeyleri 25

4.3. Sıçanların Plazma Lipit Profili 27

4.4. Omentum Ağırlığı 29

4.5. Real Time-PCR Yöntemiyle mRNA Ölçümü 30

4.5.1. Sıçanların omental adipoz dokularında IRS-1 mRNA miktarları 30

4.5.2. Sıçanların omental adipoz dokularında IRS-2 mRNA miktarları 32

4.5.3. Sıçanların omental adipoz dokularında SIRT-1 mRNA miktarları 33

4.5.4. Sıçanların omental adipoz dokularında mTOR mRNA miktarları 34

4.5.5. Sıçanların omental adipoz dokularında Foxo3a mRNA miktarları 35

4.5.6. Sıçanların omental adipoz dokularında Nrf2 mRNA miktarları 36

5. TARTIŞMA 37

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 41

KAYNAKLAR 43

EKLER 51

EK-1. Etik Kurul Belgesi 52

ÖZGEÇMİŞ 54

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. Real Time-PCR Deneylerinde Kullanılan Primer Çiftler (IRS-1, IRS-2, SIRT-1, mTOR, Foxo3a, Nrf2 ve internal standart GAPDH) 20

Çizelge 4.1. Sıçanların vücut ağırlıkları ile günlük yem, sıvı ve kalori tüketim miktarları.....21

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Fruktozun taşınması 11

Şekil 2.2. Fruktozun metabolizması 12

Şekil 4.1. Sıçanların haftalara göre ağırlık değişimi 22

Şekil 4.2. Sıçanların 30 haftalık periyot boyunca haftada bir ölçülen günlük yem tüketimi 23

Şekil 4.3. Sıçanların 30 haftalık periyot boyunca haftada bir ölçülen günlük sıvı alımı 24

Şekil 4.4. Sıçanların kan glukoz düzeyleri 25

Şekil 4.5. Sıçanların plazma insülin düzeyleri 26

Şekil 4.6. Sıçanların plazma trigliserit düzeyleri 27

Şekil 4.7. Sıçanların plazma HDL düzeyleri 28

Şekil 4.8. Sıçanların plazma LDL düzeyleri 28

Şekil 4.9. Sıçanların plazma VLDL düzeyleri 29

Şekil 4.10. Sıçanların plazma total kolesterol düzeyleri 29

Şekil 4.11. Uzun dönem fruktoz tüketiminin omentum ağırlığına etkisi 29

Şekil 4.12. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen IRS-1 mRNA ekspresyonu 31

Şekil 4.13. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen IRS-2 mRNA ekspresyonu. 32

Şekil 4.14. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen SIRT-1 mRNA ekspresyonu 33

Şekil 4.15. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen mTOR mRNA ekspresyonu 34

Şekil 4.16. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen Foxo3a mRNA ekspresyonu 35

Şekil 4.17. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen Nrf2 mRNA ekspresyonu 36

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklamalar**
g	Gram
kcal	Kilokalori
kg	Kilogram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
α	Alfa
β	Beta
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar

Kısaltmalar	**Açıklamalar**
AKT	Protein kinaz B
ALT	Alanin Amino Transferaz
ATP	Adenozin Trifosfat
CO_2	Karbondioksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
eNOS	Endoteliyal Nitrik Oksit Sentaz
FOXO	Forkhead box
GLUT	Glukoz Taşıyıcısı
HDL	High Density Lipoproteine
IL-1β	İnterlökin-1β
IRS	İnsülin Reseptör substratı
LDL	Low Density Lipoproteine
MDA	Malondialdehid

Kısaltmalar	Açıklamalar
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NaCl	Sodyum Klorür
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NEFA	Non Esterified Fatty Acids
NfkB	Nükleer Faktör Kapa β
NRF2	Nuclear Factor Erythroid Related Factor2
PI3K	Phosphatidyl Inositol 3- Kinase
SIRT-1	Sirtuin-1
SREB	Sterol Regulatory Element Binding Proteins
TNFα	Tümör Nekroz Faktör α
VLDL	Very Low Density Lipoproteine

1. GİRİŞ

Metabolik sendrom, yükselen yaşam standardının olumsuz etkisi sonucu ortaya çıkan ve günümüzde giderek önemi artan genel bir sağlık sorunudur. Bu hastalığın görülme sıklığı, başta gelişmiş ülkeler olmak üzere, bütün dünyada giderek artmaktadır. Metabolik sendrom, obezite, hiperinsülinemi, hiperlipidemi, kardiyovasküler hastalıklar ve tip II diyabeti içine alan bir hastalıklar bütünüdür. Karaciğer ve adipoz doku gibi hedef organlarda ortaya çıkan insülin direnci metabolik sendromun asıl nedeni olarak kabul edilmektedir. Bu hastalığın en önemli tetikleyicileri olarak; yoğun karbonhidrat içeren besinler, özellikle fruktoz ve sukroz içeren içecekler, doymuş yağ içeren yiyecekler ve hareketsizlik gösterilmektedir. Hayvanlarda yapılan çalışmalar, bu diyet içeriklerinin damarlarda endotel hücre fonksiyonunu bozarak ve insülin direnci oluşturarak metabolik bozukluk oluşturduğunu göstermektedir. İnsülin direnci hiperinsülinemi ile birlikte insülin etkisinde bir duyarsızlaşma olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, deney hayvanlarındaki metabolik sendrom modellerinde ve insanlarda hiperinsülineminin oluşturduğu vasküler insülin direncinin hipertansiyona yol açabileceği görülmüştür. Günlük enerji içinde toplam şeker ve fruktoz alımındaki artışın, dünya genelinde yaygınlaşan metabolik sendrom karakteristiklerinden obezite, tip 2 diyabet ve karaciğer yağlanmasının nedenlerinden biri olduğu ileri sürülmüştür. Karaciğer ve adipoz doku üzerindeki insülin reseptör substratları (IRS) insülin etkisine aracılık etmektedir. İnsülin sinyal yolağındaki insülin reseptör substratlarının ekspresyonu diyabet, metabolik sendrom ve obezite gibi patolojik durumlarda değişebilmektedir. İnsülin direnci, insülinin kas, karaciğer ve adipoz dokuya glukoz taşıma kapasitesindeki bir yetmezlik olarak tanımlanabilir. Adipoz doku, yağ ve glukoz metabolizmasında etkili hormon ve faktörleri salgılayan insülinin hedef organlarından birisidir. Adipoz doku kitlesindeki artışın insülin direnci ve düşük dereceli inflamasyona neden olduğu kabul edilmektedir. Adipoz dokuda insülin direnci ve inflamasyon ilişkisi iyi bir şekilde anlaşılmamıştır. İnsülin, adipositlerde IRS-1 ve IRS-2 üzerinden lipogenik genleri aktive ederek lipogenezisi tetiklemektedir. Bununla birlikte, IRS-1 ve IRS-2 ile ilişkili SIRT-1, mTOR, Foxo, ve Nrf2 genlerinin fruktoz ile oluşturulmuş metabolik sendrom modellemelerinde nasıl bir korelasyon gösterdiği ise tartışmalıdır.

Bu tez çalışmasıyla, fruktozun oluşturduğu metabolik sendromun, sıçanların adipoz dokusunda insülin sinyal yolağı (IRS-1, IRS-2) ve SIRT-1, mTOR, Foxo, ve Nrf2 gen

ekspresyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Literatür taraması yapıldığında, araştırma konumuz ile ilgili bilgilerin sınırlı olduğu görülmektedir. Adipoz dokusunda insülin sinyal yolağının yüksek fruktoz diyeti ile baskılandığını gösteren bu tez çalışmasının sonuçları, dünya genelinde büyük sorun haline gelen obezite, metabolik sendrom, diyabet gibi hastalıkların patofizyolojisi ile ilgili yeni yaklaşımlar sunabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metabolik Sendrom

Yaşam standardındaki yükselmenin olumsuz etkisi sonucu ortaya çıktığı kabul edilen metabolik sendrom, günümüzde önemi giderek artan genel bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Metabolik sendrom obezite, hiperinsülinemi, hiperlipidemi, hipertansiyon ile karakterize olan ve kardiyovasküler hastalıklar ile tip II diyabet için ciddi risk faktörü oluşturan bir durumdur [1]. Metabolik sendrom bel çevresi obezitesi, bozulmuş glukoz toleransı, dislipidemi ve hipertansiyon içeren bir takım fizyolojik anormallikler olarak tanımlanmıştır [2]. Metabolik sendromu oluşturan parametrelerin başında obezite gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, obezite Avrupa'daki yetişkinlerde tip II diyabet vakalarının %80'inden, iskemik kalp hastalıklarının %35'inden ve hipertansiyonun %55'inden sorumludur ve her yıl 1 milyondan fazla ölüme neden olmaktadır. Avrupa'da yetişkinler üzerinde yürütülen çeşitli çalışmalara göre, fazla kilolu olma prevalansı %30-70, obezite prevalansı ise %10-30 arasında değişmektedir [3]. Metabolik sendromun son dönemlerde hızlı bir ivmeyle artış göstermesinin temel nedenleri arasında, gelişmiş toplumların yaşam tarzının değişmesi ile hareketsiz bir yaşama adapte olmaları ve beslenme şeklinin değişmesi sayılabilir. Bu unsurların yanında, çevresel ve genetik faktörler de metabolik sendromun oluşumunda etkilidir. Metabolik sendromlu bireylerin çoğunda kilo fazlalığı, obezite ya da abdominal obezite bulunmaktadır [4].

2.2. Obezite

Obezite genel olarak bedenin yağ kütlesinin yağsız kütleye oranının aşırı artması sonucu, boy uzunluğuna göre vücut ağırlığının normal düzeyin üzerine çıkması olarak tanımlanmıştır [5]. Obezitenin oluşmasında aşırı ve yanlış beslenme, yetersiz fiziksel aktivite, yaş, cinsiyet, eğitim düzeyi, sosyokültürel etmenler, gelir durumu, hormonal ve metabolik durum, genetik yapı, psikolojik problemler ve sık aralıklarla yapılan diyet programları gibi farklı faktörlerin etkili olduğu bildirilmiştir [6]. Obezite oluşumunda dikkat çekilmesi gereken faktörlerden biri de, yaşamın ilk yıllarındaki beslenme şeklidir. Yapılan çalışmalarda, obezite görülme sıklığının anne sütü ile beslenen çocuklarda, beslenmeyenlere göre daha düşük oranlarda olduğu ve anne sütü verilme süresi, tamamlayıcı besinlerin türü, miktarı ve başlama zamanlarının obezite oluşumunu etkilediği

bildirilmektedir [7]. Fast-food kültürü, yüksek fruktoz içeren mısır şurubu kullanımı, son otuz yılda özellikle Amerika başta olmak üzere tüm dünyada hızlı bir şekilde artmıştır. Deney hayvanları ve insanlarda yapılan birçok çalışma, diyette fruktoz alımının ağırlık, lipit ve glukoz metabolizmasını etkileyerek obezite, metabolik sendrom ve diyabet riskini artırdığını göstermektedir [8].

2.3. İnsülin

İnsülin pankreastaki langerhans adacıklarının beta (β) hücreleri tarafından üretilen polipeptit yapıda 6000 dalton molekül ağırlığında bir hormondur. Molekülü iki aminoasit zincirinden oluşmaktadır. Zincirler birbirlerine iki disülfür köprüsüyle bağlanmıştır. Bu hücreler pankreas kütlesinin yaklaşık %1'ini oluştururlar. İnsülin, dokular tarafından yakıtların kullanımını düzenleyen en önemli anabolik hormonlardan biridir [9]. Bunların dışında membran enzimlerini aktive ve inaktive edebilir, birçok protein ve mRNA'nın sentez veya yıkım hızını değiştirebilir, hücre büyüme ve farklılaşmasını etkileyebilirler. İnsülin sekresyonunu uyaran en önemli maddeler glukoz, aminoasitler (özellikle arginin), glukagon, gastrointestinal hormonlar (sekretin, gastrin, vazoaktif intestinal peptit, kolesistokinin), büyüme hormonu, glukokortikoidler, prolaktin, plasental laktojen, parasempatomimetik ajanlar ve cinsiyet hormonlarıdır [10]. Somatostatin ve adrenalin insülin sekresyonunu inhibe ederler. İnsülinin glukoz metabolizması üzerine etkileri, en belirgin olarak üç dokuda gözlenir: karaciğer, kas ve yağ dokusu. Karaciğerde glikoneogenez ve glikojen yıkımını inhibe ederek, glukoz üretimini azaltır. Kas ve karaciğerde, glukojen sentezini arttırır. Kas ve yağ dokusunda hücre membranlarındaki glukoz taşıyıcılarını arttırarak glukoz alımını artırır [11]. İnsülin verilmesinden birkaç dakika sonra, yağ dokusundan yağ asidi salınmasında belirgin düşme görülür. İnsülin, yağ dokusunda lipazın aktivitesini inhibe ederek dolaşımdaki yağ asitlerini azaltır. Çoğu dokuda aminoasitlerin hücre içine girişini ve protein sentezini uyarır [12]. İnsülin; karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi çok dokuda, hücre membranlarında bulunan yüksek afiniteli özgün reseptörlerine bağlanır. İnsülin reseptörü, tek bir polipeptit olarak sentezlenir, glikozillenir ve alfa-beta alt birimlerine ayrılır [13]. Beta alt biriminin sitozolik bölümü, bir tirozin kinazdır ve insülin ile aktive olur. İnsülin aktivitesinin bir kısmının, hedef proteinlerin serin veya treonin birimlerinin fosforilasyonu veya defosforilasyonuyla olduğu bilinmektedir. Bu nedenle reseptör tirozin kinaz aktivitesiyle insülin reseptör substratı (IRS-1, IRS-2) adı verilen bir peptidin tirozinlerinin fosforile edildiği

düşünülmektedir. IRS-1 geni silinmiş farelerde glukoz homeostazının bozulduğu, glukoza toleransın geliştiği bulunmuştur [14]. İnsülinin bağlanması çok geniş etkilere yol açar. En erken yanıt, glukozun hücre içine girişinin artmasıdır. Bu olay, membran reseptörüne bağlandıktan sonra saniyeler içinde olmaktadır. İnsülinin neden olduğu enzimatik aktivite değişikleri ise, dakikalar ve saatler içinde meydana gelir (varolan proteinlerin fosforilasyon durumlarındaki değişiklikleri gösterir). İnsülin aynı zamanda birçok enzimin miktarını da arttırır [15].

2.3.1. İnsülin sinyal yolağı

İnsülin etki mekanizmasındaki ilk basamak hormonun, hedef hücredeki spesifik ve yüksek afiniteli reseptörlerle ilişkiye girmesidir. İnsülinin çeşitli etkileri özel bir transmembran olan glukoprotein reseptöre bağlanması ile başlamaktadır. İnsülin adiposit ve kas hücreleri yüzeyindeki reseptörünü etkileyerek, insülin reseptör substratlarının (IRSs) fosforilasyonunu tetikler. Fosforile insülin reseptör substratı, fosfotidil inozitol 3-kinaz ve Akt/protein kinaz B'yi aktive eder. Sonuçta intraselüler glukoz havuzunda duran glukoz taşıyıcısı GLUT-4 ün adiposit ve miyosit plazma membranına hareket etmesine neden olur. GLUT-4'lerin adiposit ve kas hücresi plazma membranında çokça eksprese olması etkili bir glukoz alımına neden olur. Böylece plazma glukoz artışı ve neticede de insülin artışı önlenmiş olur [16].

<u>İnsülin reseptör substratları (IRS-1 / IRS-2)</u>

İnsülin reseptörleri hücre membranı üzerinde yer alan 2α ve 2β alt birimlerinden oluşan yapılardır. İnsülinin reseptörlerin α alt birimi ile temasıyla etki gösterdiği bilinmektedir. Bu bağlanma, reseptörün α alt biriminde allosterik değişikliğe neden olur. İnsülin reseptörünün hücre içerisinde yer alan β alt birimi ise, α alt biriminin insülinle temasından sonra fosforile olur ve intrasellüler bölümde yer alan tirozin rezidülerinin fosforilasyonu ile insülin reseptör substratının aktive olmasını sağlar. Literatüre göre insan vücudunda dört farklı insülin reseptör substratı yer almaktadır. Bunlardan IRS-1 ve IRS-2 intrasellüler sinyal ileti sisteminde en fonksiyonel proteinlerdir. IRS-1 öncelikle kas ve yağ dokusunda glukoz transportu ve hücre büyümesine etkin iken; IRS-2, daha ön planda karaciğer dokusunda glukoz transportundan sorumludur [17].

İnsülin sinyal yolağı üzerinde diğer fonksiyonel yapılar

Sırtuinler ilk kez mayalarda keşfedilen sessiz regülatör proteinlerdir. Günümüzde insanlarda yedi farklı sırtuin geni saptanmıştır. Bu proteinlerin etkinliği için NAD+ kofaktörü gerekmektedir. Sırtuinlerle ilgili yapılan ilk çalışmalarda sırtuin etkinliğinin kalori kısıtlaması durumunda arttığı saptanmıştır. Günümüzde diyabet, obezite, metabolik sendrom, karaciğer yağlanması ve yaşlanma gibi patolojik ve fizyopatolojik durumlarda etkinliğinin değiştiği saptanmıştır [18]. En son bilgilere göre sırtuinlerin metabolik fonksiyonların sürdürülmesinde kritik bir rol oynadığı anlaşılmaktadır. Farelerde yapılan çalışmalarda hipotalamustaki SIRT-1 ekspresyonunun vücutta enerji kullanımının düzenlenmesinde rol aldığı saptanmıştır. Bir başka araştırmada arcuate nukleusundaki SIRT-1 ekspresyonundaki artışın farelerde yaşlanma ile ortaya çıkan kilo artışının nedeni olduğu saptanmıştır [19]. Farelerde nöronlardaki SIRT-6 geninin silinmesinden sonra obezite geliştiği saptanmıştır. Obez bireylerin deri altı ve visseral adipoz doku artışının SIRT-1 ekspresyonundaki azalma ile birlikte seyrettiği saptanmıştır [20]. Benzer şekilde kilo kaybeden kişilerin deri altı yağ dokusu ve karaciğer doku örneklerinde SIRT-1, SIRT-3 ve SIRT-6 ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Adipoz dokunun inflamasyonunda sırtuinin önemi konusunda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. SIRT-1'in adipoz doku inflamasyonu ve makrofaj infiltrasyonun esas regülatorü olduğu saptanmıştır. SIRT-1'in adipositlerde TNFα etkilerini inhibe ettiği, tersine TNFα artışı durumunda insan adipositlerinde SIRT-1 ekspresyonunun baskılandığı saptanmıştır. Yüksek yağlı diyet ile beslenen maymunların adipoz doku inflamasyonun SIRT-1 analoğu resveratrol ile azaltıldığı saptanmıştır [21].

Yağ dokusu sistemik enerji homeostazisinin düzenlenmesinde çoklu fonksiyonu olan oldukça adaptif bir dokudur. mTOR, 1-fosfoinozitit 3-kinaz (PI3K) benzeri serin/treonin bir protein kinaz olup protein lipit sentezi ile hücre büyümesi, proliferasyonu, diferansasyonu, otofaji ve metabolizmasında rol alan bir moleküldür. mTOR'un katabolik gövdesi iki farklı protein kompleksinden (mTORC1, mTORC2) oluşup rapamisin adlı antibiyotiğe duyarlıdır. Yağ dokusunda sentezlenen mTOR kompleksleri çeşitli anabolik ve katabolik olaylardan lipit, protein, nükleotid, adipokin sentezi, termogenezis ve lipolizis gibi farklı olayların düzenlenmesinde belirleyici bir rol almaktadır. mTOR sinyal yolunun uyarılması ektopik lipit akümülasyonunu ve nonadipoz dokudaki lipotoksisiteyi önlemektedir [22].

mTORC1 sinyal yolunun genetik olarak ve rapamisin ile inhibisyonu adipogenezisi azalttığı, tersine bu yolun aktivasyonunun adipogenezisi uyardığı bulunmuştur. Bu bulgular mTOR1'in adipogenezisin pozitif regülatorü olduğunu göstermektedir. mTORC2'nin adipogenezis üzerindeki fonksiyonları ise henüz tam bilinmemektedir. Hücre kültürü çalışmasında 3T3-L-1 adipositlerinde mTORC1 uyarılmasının SREB (steroit regulatory element binding protein) aktivasyonuyla lipogenezisi arttırdığı saptanmıştır. Farelerde mTORC1 aktivasyonunun obezite ve insülin direnciyle arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, mTORC1 eksikliğinin adipoz dokuda TNFα ve IL-6 artışıyla inflamasyona neden olduğu gösterilmiştir [23]. Foxo ailesi memeliler, meyve sinekleri, solucanlarda çeşitli proteinleri fosforile ve asetilleyerek işlev gören proteinlerdir. Örneğin Foxo proteinleri SIRT-1 promoter bölgesine bağlanabilir ve IRS-1 aktivasyonunu değiştirebilir. Foxo proteinlerinin hücrenin yaşamsallığı ve yenilenmesinde kritik rolü olduğu bildirilmiştir. Foxo protein aktivasyonunun oksidatif stres sırasında apoptotik hücre tahribatını önlediği gösterilmiştir [24]. Çeşitli araştırmalarda Foxo1 proteinlerin inaktive edilmesinin diyabet sırasında hücre ölümünü arttırdığını göstermektedir. Endotel hücrelerinin yüksek glukoza maruziyeti sırasında Foxo1'in asetillendiği ve erken hücre ölümü gerçekleştiği saptanmıştır. Yüksek glukoza maruziyetinin, Foxo aktivasyonuyla mitokondriyal membran depolarizasyonuna, kaspaz aktivasyonu ve apoptotik hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir [25]. Farelerin iskelet kasında Foxo1 ekspresyonundaki artışın glisemik kontrolü ve kas fonksiyonunu zayıflattığı gösterilmiştir. Foxo proteinlerin insülin benzeri growth faktör bağlayan proteini uyarabileceği, Akt aktivasyonu aracılığıyla insülin etkinliğini kontrol edebileceği belirtilmiştir. Foxo1 ekspresyonunun meyve sineği ve memeli hücrelerinde insülin sinyal yolağını aktive ederek selüler metabolizmayı düzenleyebileceği bildirilmiştir [25,26].

Nrf2 metabolik sendrom ve sonucu ortaya çıkan kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde anahtar antioksidan düzenleyici bir faktör olarak görülmektedir. Herhangi bir uyaran olmadığı durumlarda Nrf2 Keap1 proteini ile kompleks yapmış bir şekilde sitoplazmada bulunmaktadır. Oksidatif stres ile Nrf2 kompleks yapıdan ayrılıp nükleusa geçerek detoksifiye edici proteinler ve antioksidan enzimlerin aktivasyonuna neden olur. Etkileştiği antioksidan genler arasında SOD, katalaz, glutatyon, S-transferaz bulunmaktadır. Yakın çalışmalarda Nrf2'nin yalnızca antioksidan bir sistem tetikleyicisi olmadığı, aynı zamanda obezitede glukoz ve lipit metabolizmasının önemli düzenleyicilerinden biri olduğu ortaya konulmuştur [27]. Yapılan birçok araştırmada Nrf2 gen silinmesinin oksidatif stresi

arttırdığı ve obeziteyi şiddetlendirdiği bildirilmiştir. Fakat bazı çalışmalarda da Nrf2 geni knock-out farelerde obezitenin kötüleşmesini önlediği saptanmıştır [28]. Obez farelerde adipositlerdeki Nrf2 geninin spesifik olarak silinmesinden sonra adipoz doku kitlesinde azalma olduğu; fakat insülin rezistansı, hiperglisemi, hipertrigliserideminin şiddetlendiği gösterilmiştir. İlaç geliştirme çalışmalarında çeşitli Nrf2 analogları geliştirilmiş olup bunların obezite ve insülin rezistansının düzeltilmesi, oksidatif stresin azaltılmasında potansiyel ilaçlar olabileceği bildirilmiştir. Yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde Nrf2 eksikliğinin beyaz adipoz doku kitlesini azalttığı saptanmıştır. Nrf2 geni aktive edilmiş hayvan modeli çalışmalarında ise adipoz dokuda lipit akümülasyonunun arttığı; fakat yağ asitlerinin β-oksidasyonunun azaldığı saptanmıştır [29].

2.3.2. İnsülin direnci

Metabolik sendromun asıl nedeni insülin direnci ve buna bağlı olarak da kardiyovasküler hastalıkların gelişmesi olarak kabul edilmektedir [30,31]. Hiperinsülinemi ile gelişen insülin direnci, insülin etkisinde bir duyarsızlaşma olarak tanımlanmaktadır [32]. İnsan çalışmaları ve deney hayvanlarındaki metabolik sendrom modelleri sonucunda hiperinsülineminin oluşturduğu vasküler insülin rezistansının hipertansiyona yol açabileceği görülmüştür [33]. İnsülin direnci sonucunda ortaya çıkan metabolik sendromun göstergelerinden biri de abdominal bölge yağlanmasıdır [34]. Metabolik sendrom için risk faktörleri insülin direnci ve abdominal obezitedir. Bunun yanında yaşlanma, hareketsizlik ve hormonal dengesizlik de risk faktörleri arasındadır [35].

İnsülin direnci, plazma glukoz düzeyinin normal sınırlarda tutulmasında ve glukoz hemeostazında insülinin etkinliğinin azalması ya da bozulması veya insüline verilen doku cevabının yetersiz kalması olarak tanımlanabilir. İnsülin direnci normal konsantrasyondaki insülinin normalden daha az biyolojik yanıt oluşturması, glukoz kullanımını uyarma etkisinin azalmasıdır. *İn vivo* ortamda, plazma insülini belirli kan şekeri düzeyine göre bulunması gereken konsantrasyonun çok üzerinde (hiperinsülinemi) ise insülin direncinden bahsedilir [36]. Metabolik açıdan ise insülin direnci, insülinin hücre düzeyindeki metabolik olaylara etkisinin veya insüline karşı hücre düzeyindeki normaldeki duyarlılığın azalması olarak ifade edilebilir [37]. Normalde insülin karaciğerde glukoneogenezi ve glikojenolizi inhibe ederek hepatik glukoz üretimini baskılar. İnsülin direncinde insülinin karaciğer, kas ve yağ dokusundaki bu etkilerine karşın direnç oluşarak hepatik glukoz supresyonu

bozulur. Kas ve yağ dokusunda da insülin aracılığı ile olan glukoz kullanımı azalır. Bu durumda insülin salgısının arttırılması ile metabolik durum kompanse edilir. Böylelikle hipergliseminin önlenebilmesi için beta hücreleri sürekli olarak insülin salgısını arttırır. Sonuçta normoglisemi sağlanırken insülin düzeylerinde de normale oranla 1,5-2 kat yüksek bir seviye oluşur. Bu hiperinsülinemik kompensasyon sürecindeki beta hücrelerinde başlangıçta herhangi bir bozukluk yoktur. Fakat beta hücresinde fonksiyon kaybı başladığında, insülin salgısı da giderek azalmakta ve diyabet ortaya çıkmaktadır [38].

İnsülinin duyarlı organlarda etki gösterebilmesi için özgün reseptörlerine bağlandıktan sonra IRS-1 ve IRS-2 gibi proteinleri aktive ettiği bilinmektedir. Bu proteinlerin intraselüler kompartmanda sinyal yolu üzerindeki pek çok proteini de etkilediği saptanmıştır. İnsülin direnci durumunda IRS-1 ve sinyal yolundaki diğer aracı proteinlerin baskılandığı bulunmuştur [39]. İnsülin rezistansı durumunda vücuttaki yağ dağılımda değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Bu durum insülinin hem lipolitik hem antilipolitik etki göstermesiyle açıklanabilir. İnsülin direncinin özellikle abdominal bölge yağlanması ile paralel seyrettiği görülmektedir. İnsülin direnci durumunda adipoz doku kitlesindeki artış dikkat çekici olmakla birlikte en çok abdominal bölgedeki genişleme ve adipositlerde hipertrofik değişiklikler ile bu bölgeye makrofaj infiltrasyonu dikkat çekmektedir. Yağ dokusu içinde toplanan makrofajların proinflamatuar sitokinleri aktive ettiği bulunmuştur. Bu olay insülin rezistansının inflamasyonla karakterize bir hastalık olduğunu göstermektedir [40].

2.4. Fruktoz

Fruktoz, birçok besin maddesinde bulunan altı karbonlu bir monosakkarittir. Beyaz katı bir görünüme sahip olan fruktoz, suda çok kolay çözünür. Bal, ağaç meyveleri, kavun ve karpuzun da dâhil olduğu familyadaki meyveler, dutsu meyveler ve bazı kök sebzeleri, yüksek miktarlarda fruktoz ve glukoz içerir. Fruktoz, glukoz ile birlikte yüksek fruktoz içeren mısır şurubunun bir bileşeni olarak ya da sukroz molekülünde bir bileşen olarak, içecek ve birçok hazır gıdada ana tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Son dönemde yapılan çalışmalar, insanlarda yüksek fruktoz tüketiminin metabolik hastalıklar için bir risk faktörü olduğunu açıkça göstermektedir. Hipertansiyon, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı,

dislipidemi, insülin direnci, tip 2 diyabet, obezite ve metabolik sendromun da dâhil olduğu patolojilerin çoğu fruktoz tüketimini işaret etmektedir [41].

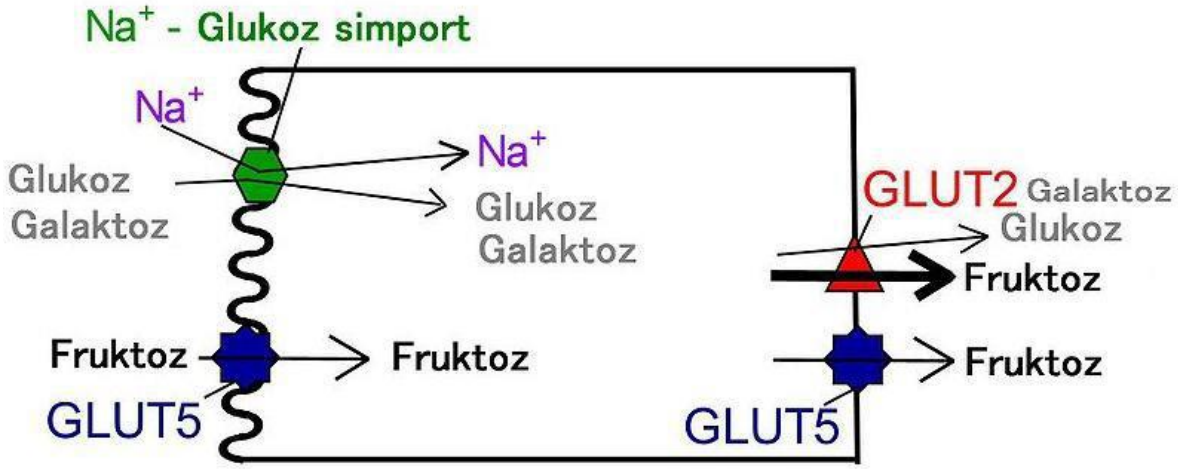
Deney hayvanlarının yemine (%60-66) ya da içme suyuna (%10-30) eklenen saf fruktoz ile 3. haftadan başlayarak; insülin rezistansı, hipertrigliseritemi, hipertansiyon ve karaciğer yağlanması ile karakterize metabolik sendrom tablosu oluştuğu saptanmıştır [42]. Fruktoz konsantrasyonu ve beslenme süresi, oluşan metabolik sendromun şiddetini değiştirmektedir [43]. Enerji gereksiniminin %25'inin fruktoz ya da glukozdan karşılandığı gönüllüler üzerinde yapılan bir araştırmada, fruktoz tüketen grupta iç organ yağlanması, postprandiyal trigliserit, oksidize olmuş LDL ve total kolesterol ile açlık plazma glukoz ve insülin düzeylerinin glukoz tüketen gruptan daha yüksek olduğu saptanmıştır [44]. Karaciğer yağlanması saptanan kişilerde, günlük şekerli içecek tüketiminin sağlam kişilerden iki kat daha fazla olduğu bildirilmiştir [45].

Diyet içinde yüksek fruktoz uygulamasının plazma trigliserit düzeyi artışı eşliğinde karaciğer yağlanması ve insülin rezistansına neden olduğu gösterilmiştir [46]. Deney hayvanlarında, fruktozdan zengin diyetin yağ asitleri sentezinde görevli enzimleri artırarak hepatik steatozis oluşturduğu anlaşılmıştır. Fruktozun oluşturduğu hepatik steatosisin inflamatuvar mediyatörlerin artışı ile birlikte seyrettiği saptanmıştır [47]. Farelere içme suyu içinde 8 hafta boyunca %30 fruktoz verilmesiyle portal kan içinde endotoksin miktarının arttığı ve karaciğer trigliserit akümülasyonu geliştiği görülmüştür. Bu değişikliklerin barsaktan absorbe olmayan antibiyotik tedavisi ile düzeldiği gösterilmiştir [48]. Barsak mikrobiyotasının bozulması, endotoksinlere geçirgenliğinin artması ve inflamasyon ile hepatik yağlanma arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir [49]. Fruktozdan zengin diyetle beslenen sıçanlarda, barsak mikrobiyota kompozisyonunun *Coprococcus* ve *Ruminococcus* lehine değiştiği, parelel seyreden plazma TNFα ve lipopolisakkarit düzeylerindeki artışının antibiyotik tedavisi ile önemli ölçüde düzeldiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, adipoz doku insülin rezistansının antibiyotik uygulamasına olumlu cevap verdiği bulunmuştur [50,51].

2.4.1. Fruktozun absorbsiyonu

Fruktozun bağırsakta absorbsiyonu, fruktoza özgü GLUT5 taşıyıcısı üzerinden gerçekleşir. Glukoz ile karşılaştırıldığında fruktozun emilimi daha sınırlıdır. GLUT2 fruktoz, glukoz ve

galaktozun taşınmasında tek yönlü olarak görev yapmaktadır [52]. Fruktozun emilimi, bireyler arası farklılık göstermektedir. Buna bağlı olarak, fruktoz glukozdan ayrı absorbe edildiğinde, fruktozun yaklaşık %80-90'ı yapısal olarak bozulmadan emilir [53].

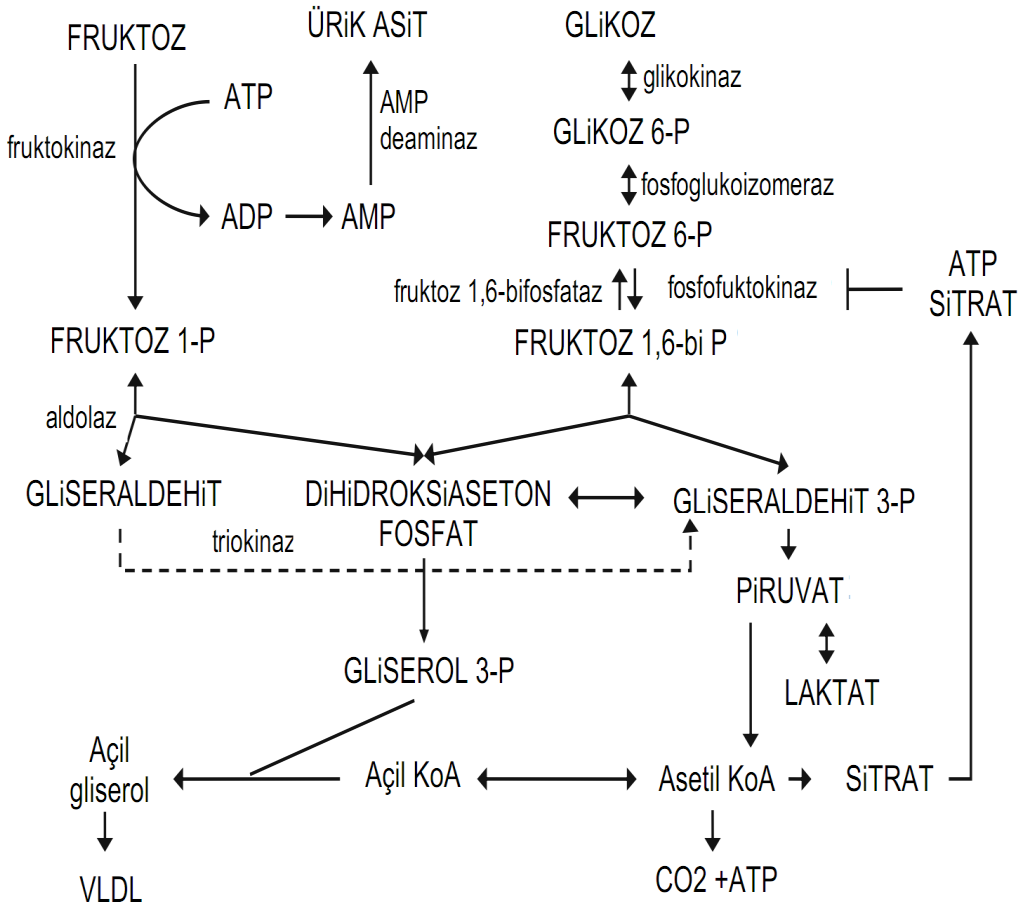


Şekil 2.1. Fruktozun taşınması [44]

2.4.2. Fruktozun metabolizması

Fruktozun hepatik metabolizması glukozdan oldukça farklıdır. Glukoz, karaciğerde öncelikle glukokinaz ile glukoz-6-fosfata fosforile olur. Fruktoz ise, karaciğerde fruktokinaz ile metabolize olur. Takiben fruktoz-6-fosfat ve sonrasında fruktoz 1,6-bifosfata dönüştürülür. Bu dönüşümün hızı, ATP ve sitrat tarafından inhibe edilebilen ve glikolizin temel hız kısıtlayıcı enzimi olan fosfofruktokinaz tarafından düzenlenir. Fruktoz 1,6-bifosfat, Krebs döngüsüne girmeden hemen önce piruvata dönüştürülür. Glukozun piruvata hepatik dönüşümü insülin tarafından düzenlenir. Bu sürece ters olarak, fruktozun trioz-fosfata dönüşümü insülinden bağımsız olarak gerçekleşen hızlı bir süreçtir. Fruktoz, glikolizin temel düzenleyici basamağı yani fosfofruktokinaz basamağını atlar ve glikolitik yola girer. Bu hız, fruktokinazın fruktoza afinitesinin daha fazla olmasından ve ATP ya da sitrat gibi düzenleyici yapıların negatif geri bildiriminden etkilenmemesinden kaynaklanmaktadır. Fruktozdan üretilen trioz-fosfatın küçük bir kısmı piruvata dönüştürülerek, CO_2 ve suya okside olur. Diğer küçük bir kısmı ise, laktata dönüştürülerek dolaşıma salınır. Fruktozdan oluşan trioz-fosfatın çok büyük bir kısmı ise, glukoneogenez ile glukoz ve glukojene dönüştürülür. Fruktozdan arta kalan karbon, yapı temelde yağ asitlerine dönüştürülmektedir. Fruktozun yağ asidi reesterifikasyonu ile VLDL-trigliserit

sentezini destekleyerek, hepatik lipit oksidasyonunu inhibe ettiği düşünülmektedir. Böylece, fruktoz hızla ve hiçbir kontrol mekanizması olmadan glukoz, glikojen, laktat, piruvat oluşumuna neden olabilmektedir. Bu yolağın düzenlenmesindeki yetersizlik, karaciğerde yüksek miktarda VLDL ve trigliserit sentezi ile sonuçlanabilir [54].



Şekil 2.2. Fruktozun metabolizması [32]

2.4.3. Diyet içerisinde yüksek fruktoz alımının adipoz doku üzerine etkisi

Adipoz doku, yağ ve glukoz metabolizmasında etkili hormon ve faktörleri salgılayan insülinin hedef organlarından birisidir. Adipoz doku kitlesindeki artışın insülin direnci ve düşük dereceli inflamasyona neden olduğu kabul edilmektedir [55]. Adipoz dokuda insülin rezistansı ve inflamasyon ilişkisi iyi bir şekilde anlaşılmamıştır. İnsülin, adipositlerde IRS-1 ve IRS-2 üzerinden lipogenik genleri aktive aderek lipogenezisi tetiklemektedir [56]. Hiperinsülinemik farelerde IRS-1 ve IRS-2 fosforilasyonunun adipoz dokusunda arttığı gösterilmiştir [57]. Adiposit hücrelerinin IL-6, IL-1β ya da TNFα ile uzun süreli inkübasyonundan sonra insülin sinyal yolağının baskılandığı ve insülin direnci geliştiği

saptanmıştır [58]. Diyet ile oluşturulan obezitenin adipoz dokuda IL-1, IL-6 ve TNFα'yı artırdığı, böylece IRS-1 serin fosforilasyonuna neden olarak insülin rezistansına yol açtığı gösterilmiştir [59]. Yüksek fruktoz diyetinin karaciğerde inflamasyon faktörlerini aktive ettiği, fakat adipoz dokuda değiştirmediği saptanmıştır [58].

Diyet içinde fruktoz verilmesinin adipoz doku fonksiyonları üzerindeki etkisi çok az bilinmektedir. Adipoz doku ilk başlarda fazla enerji depo organı olarak dikkate alınmıştır. Fakat günümüzde çok fonksiyonlu bir doku olduğu anlaşılmıştır. Beyaz ve kahverengi olmak üzere başlıca iki tip adipoz doku bulunmaktadır [59]. Yüksek enerjili diyet ile beslenme sonrasında adipoz doku kitlesinin hipertrofik ve hiperplastik genişlemeye uğradığı saptanmıştır [60]. Enerji kısıtlaması durumunda adipoz dokudaki lipit depolarının lipoliz sonucu azaltıldığı ve kan dolaşımına yağ asitlerinin salgılandığı saptanmıştır. Günümüzde adipoz dokunun çeşitli hormon ve biyoaktif maddeleri sentez edip salgılayan bir doku olduğu ortaya çıkmıştır [61]. İnsanlar üzerinde yapılan benzeri bir çalışmada da yüksek fruktoz ihtiva eden içeceklerin karın içi organlarda yağ toplanmasını tetiklediği; fakat aynı durumun glukoz içeren içeceklerle ortaya çıkmadığı gösterilmiştir [62]. Laboratuvarımızda yapılan bir araştırmada yüksek fruktoz içeren diyet ile beslenen sıçanlarda kilo artışından bağımsız olarak abdominal obeziteye neden olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, yüksek fruktoz diyetinin adipoz dokuda, insülin sinyal yolağı genleri; IRS-1, IRS-2, Akt, PI3K, eNOS ve mTOR ekspresyonu ile inflamasyon parametrelerini birlikte uyardığı saptanmıştır [63]. Adipositlerde insülin etkisinin insülin reseptör stimulasyonundan sonra IRS-1 ve IRS-2 aracılığıyla intraselüler efektörlere aktarıldığı bilinmektedir [64]. İnsülin sinyal yolağının adipoz dokuda SIRT-1, eNOS, mTOR yolakları ile de ilişkide olduğu gösterilmiştir [65,66]. Yüksek fruktoz içerikli diyetin karaciğerde hiperinsülinemi ve lipogenezisi arttırdığı, ektopik lipit depolanmasına neden olduğu gösterilmiştir [67]. Yüksek yağ ve fruktoz içerikli diyetlerin farelerin adipoz dokusunda FAS genini uyararak lipogenezi stimüle ettiği saptanmıştır [68]. Farelerde IRS-2 geninin tahrip edilmesinden sonra adipoz dokuda insülin reziztansı geliştiği saptanmıştır. Hiperinsülinemik farelerin adipoz doku örneklerinde IRS-1 ve IRS-2 fosforilasyonunun arttığı bulunmuştur [69]. Daha önceki araştırmalarda fruktoz diyetinin karaciğer, iskelet kası ve damarlarda insülin sinyal yolağındaki genleri baskıladığı bulunmuştur [70]. Bu bulgular insülin sinyal yolağı uyarılması ile adipoz doku kitlesinin artışına ve visseral yağlanmaya neden olabileceği önerisinin ortaya atılmasını sağlayabilir. İçme suyu içinde 3 hafta boyunca fruktoz verilmesinden sonra abdominal doku kitlesinin arttığı ve IRS-1,

IRS-2 genlerinin ekspresyonunda baskılanma olduğu saptanmıştır [71]. Başka bir araştırmada ise 10 ay boyunca yüksek fruktoz içeren mısır şurubu tüketiminin intraabdominal adipoz doku kitlesini arttırdığı, IRS-1 genini baskıladığı saptanmıştır. Bu bulgular yüksek fruktoz diyetinin adipoz dokuda insülin sinyal yolağı üzerine etkisinin henüz net olarak anlaşılmadığını göstermektedir [72]. Deneysel obezite çalışmalarında makrofajların adipoz dokuya infiltre olduğu ve proinflamatuvar sitokinlerden IL-1β, TNFα ve IL-6'yı aktive ederek insülin rezistansına katkıda bulunduğu belirtilmiştir.Aynı çalışmada adipositlerin sitokinlere uzun süreli inkübasyonu sonucunda insülin sinyal yolağının baskılandığı ve insülin rezistansı geliştiği saptanmıştır [56]. Yüksek fruktoz diyeti verilen sıçanlarda inflamatuvar faktörlerden NfκB ve TNFα düzeylerinin karaciğerde arttığı fakat adipoz dokuda değişmediği bulunmuştur. Bu durum fruktoz diyetinin doku spesifik etkilerine işaret etmektedir [69]. Laboratuvarımızda yapılan diğer bir çalışmada ise yüksek fruktoz diyetinin adipoz dokuda inflamatuvar belirteçlerden iNOS, TNFα, IL-1β, IL-18, MDA ve ALT düzeyleri ile antiinflamatuvar faktörlerden IL-10, Nrf2 ve mTOR'u da arttırdığı saptanmıştır. Antiinflamatuar faktörlerdeki bu artışın inflamasyona karşı kompensatuvar bir mekanizmanın tetiklenmesiyle açıklanmıştır [70]. İnsülin direnci, açlık hiperinsülinemisi durumunda insülin etkisindeki bir azalma olarak tanımlanır [71]. Fruktoz (%10) içeren diyet ile 6 hafta beslenen sıçanlarda CYP2J3 gen ekspresyonunun, eNOS ve insülin direnci üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, aorta IRS-1, PI3K, eNOS ve fosforile MAPK protein düzeyleri ölçülmüştür. Fruktoz içeren diyetin IRS-1, PI3K/Akt ve MAPK sinyal yolağını inhibe ederek, aorta ve iskelet kasında eNOS düzeylerini azalttığı saptanmıştır [72].

Fruktoz lipojenez açısından etkili bir uyarıcıdır. Uzun süreli fruktoz diyeti ile hepatik lipogenez tetiklenmekte ve bunun sonucu trigliserit ve VLDL partiküllerinin aşırı üretilmesiyle adipositlerde hızlı ve aşırı yağ depolanmaktadır. Bu durum adipositlerden kaynaklanan serbest yağ asit salınımı ve adipokin salgısında değişikliklerin art arda meydana gelmesini tetiklemektedir [73]. Fruktozun düşük glisemik indekse sahip olmasına rağmen insülin ile baskılanamaması nedeniyle insülin direnci gelişmesine neden olarak Tip 2 diyabet ve metabolik sendrom riskini artırdığı belirlenmiştir. Yüksek fruktoz tüketimi adipogenez ve buna bağlı olarak yüksek oranda esterleşmemiş yağ asit (NEFA) sentezine ve vücut ağırlığında artışa neden olmaktadır. NEFA'daki artış, hepatik glukoz üretimini artırmakta, insülin reseptörlerinin bulunduğu kas hücrelerindeki intraniyosellüler lipid içeriğini artırarak insülin duyarlılığını azaltmakta ve ß hücre fonksiyonu üzerinde zararlı

etki göstermektedir [74]. Aynı zamanda NEFA'daki artış, triaçilgliserol konsantrasyonlarında artışa neden olmakta ve bu da insülin duyarlılığını azaltmaktadır. Yüksek fruktoz tüketimi, adiponektin yanıtını azaltarak insülin direncine neden olmaktadır [75]. Erkek Sprague Dawley sıçanlar, 5 hafta boyunca içme suyu içerisinde fruktoz (%10) ile beslenmiş ve bir gruba pcDNA-eNOS enjekte edilmiştir. Çalışma sonunda, fruktoz tüketiminin aorta, böbrek, kalp ve karaciğer dokularında IRS-1, PI3K/Akt ve MAPK sinyal yolaklarının inhibisyonuna bağlı olarak eNOS düzeyini azalttığı, pcDNA-eNOS enjeksiyonu ile IRS-1,2 ve PI3K/Akt düzeylerinin anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir [76]. Sprague-Dawley sıçanların içme sularına %10 fruktoz verilmesiyle 8 hafta sonunda hipertansiyon oluştuğu saptanmıştır [77]. Freitas RR araştırmasında hayvanların içme suyu içine %23 glukoz, fruktoz ve sukroz verilerek metabolik sendrom oluşturduğu bildirilmiştir [78]. Hwang ve arkadaşları yüksek fruktoz ile beslenen sıçanlarda insülin rezistansı, hiperinsülinemi, hiperglisemi ve hipertansiyon oluştuğunu belirtmişlerdir [30]. Yüksek fruktoz içeren diyet ile 40 hafta beslenen erkek Sprague-Dawley sıçanların kan basıncı ölçüldüğünde sistolik kan basıncının anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Mezenterik arterde asetilkolin gevşemeleri azalmış ve kısmen NOS inhibitörü ile inhibe edildiği gösterilmiştir [79].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmanın deneysel protokolü Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Komitesinin, G.Ü. ET-14.054 kararı ile onaylanmıştır.

3.1. Hayvanlar ve Diyet

Deneyler için 8 haftalık erkek Sprague Dawley ırkı sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyoduna uygun, sıcaklığı 22 ^{o}C olarak ayarlanmış nem kontrollü odalarda bakılmışlardır. Hayvanlar standart sıçan yemi (Kuru madde: %88, protein: %23, selüloz: %7, ham kül: %8, HCl' de çözülmeyen kül: %2, kalsiyum: %1.5, fosfor: %0.9, sodyum: 0.7, tuz (NaCl): %1, metiyonin: 0.3, lizin:1) ile beslenmişlerdir. Bir haftalık adaptasyon döneminden sonra bir grup hayvana 30 hafta boyunca çeşme suyunda çözülmüş %15 fruktoz verilmiştir. Kontrol grubuna sadece içme suyu verilmiştir. Hayvanların başlangıç ve belirli zamanlardaki vücut ağırlıkları, tükettikleri yem ile su miktarları haftalık ölçümlerle kaydedilmiştir. Belirli aralıklarla kuyruk venininden kan örnekleri alınıp glukoz (Contour TS, Bayer) ve trigliserit (Accutrend Plus, Roche) düzeyleri ölçülmüştür. Deney sonunda hayvanlar ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezi edildi. Deney günü sıçanların sakrifikasyonundan hemen sonra intrakardiyak alınan kan örneklerinden glukoz, insülin ve plazma lipit düzeyleri ölçülmüştür. Sıçanların azot gazında dondurulup ve -85 ^{0}C'de saklanan adipoz dokusunun (100-300 mg) homojenizasyonu yapılıp Reel Time PCR yöntemi ile IRS1, IRS2, SIRT-1, Nrf2, Foxo3a ve mTOR gen ekspresyonu tayini yapılmıştır.

Deney grupları aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

1. Kontrol sıçanlar
2. Fruktoz (içme suyu içerisinde %15) alan sıçanlar

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)'dan temin edilmiştir. Fruktoz, Danisco Sweeteners OY (Finland)' den sağlanmıştır.

3.3. Sıçanların Ağırlık, Günlük Yem, Sıvı Tüketimi ve Kalori Alımı Hesaplanması

Sıçanların ağırlıkları haftada bir kez olmak üzere hassas terazi kullanılarak tespit edilmiştir. Yem tüketimleri haftada bir kez olmak üzere hassas terazi kullanılarak, başlangıç saatinde kafes yemliğindeki yem ile 24 saatin sonunda kalan yem arasındaki fark hesaplanarak bulunmuştur. Denek sayısı başına günlük yem tüketimi olarak hesaplanmıştır. Sıvı tüketimleri damla akıtmaz şişelere, başlangıç saatinde koyulan sıvı hacmi ile 24 saat sonunda kalan sıvı miktarı arasındaki fark hesaplanarak bulunmuştur. Denek sayısı başına günlük sıvı tüketimi olarak hesaplanmıştır. Kalori alımı günlük yem tüketiminden (3.5 kkal/g) ve fruktoz (3.7 kkal/g) içeren sıvı tüketiminden toplanarak hesaplanmıştır.

3.4. Plazmada Glukoz, İnsülin ve Lipit Profilinin Düzeylerinin Belirlenmesi

Anestezi sonrası sıçanların toraks ve abdomeni açıldıktan sonra intrakardiyak olarak alınan kan örneklerinde şeker ölçüm cihazı kullanılarak (Contour TS, Bayer) kan glukoz düzeyi ölçülmüştür. Ölçümler en az 3 kez tekrarlanarak ortalamaları alınmıştır. İntrakardiyak alınan 2 cc kan örneği 2200 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrılmış, ependorf tüplerine koyularak ve -85°C' de saklanmıştır. Plazma örneklerinde trigliserit, HDL, LDL, VLDL ve total kolesterol düzeyleri uygun enzimatik analiz kitleri kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler, ROCHE COBAS INTEGRA 800 analizöründe ROCHE COBAS (Roche Diagnostics GmbH, D68298 Mannheim) tarafından üretilen kitler kullanılarak yapılmıştır. Plazma insülin düzeyleri ise rat spesifik insülin ELISA kitleri (Mercodia) ile üretici firmanın kullanım talimatına uygun olarak ölçülmüştür.

3.5. Gerçek Zamanlı PZR (Real time-PCR)Yöntemiyle mRNA Miktar Tayini

Omentum dokusuna ait toplam RNA'lar, Fermentas GeneJet total RNA saflaştırma kiti kullanılarak üreticinin kılavuzuna göre izole edildi. Toplam RNA izolasyonundan sonra, RNA'ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezi, RNA konsantrasyonu ve protein kontaminasyonu ise MultiscanGO spektrofotometre ile 260 ve 280 nm de spektrofotometrik ölçümler ile kontrol edildi. cDNA sentezi yöntemine göre 1 µg toplam RNA'ya 1 µl oligo (dT)15 primer (100mM) eklendi. Sonra, hacim DEPC-distile su ile 12 µl'ye tamamlandı. Daha sonra, örnek solüsyonu yavaşça karıştırılıp 70°C'de 5 dakika

inkübe edildi ve buz üzerinde soğutuldu. Sonra 4 µl 5xM-MuLV reaksiyon tamponu ve 1 µl RiboLockTM (20 u/ µl) (MBI Fermentas, USA) eklendi. 2 µl 10mM dNTP karışımı eklendikten sonra tüpler 37°C'de 5 dakika inkübe edildi. Son olarak, 1 µl M-MuLV Revers Transkriptaz (200 u/µl) eklendi ve cDNA sentez reaksiyonu 1 saat süre ile 42°C'de gerçekleştirildi. Ters transkriptaz denatürasyonu için 70°C'de 5 dakika bekletilen cDNA örnekleri buz üzerinde soğutulduktan sonra qPCR reaksiyon çalışmalarına kadar -85°C'de saklandı.

3.6. Kuantitatif Gerçek Zamanlı PZR (Real time-PCR)

Omentum dokusunda IRS-1, IRS-2, SIRT-1, mTOR, Foxo ve Nrf2 genlerine ait mRNA miktarları SYBR Green I reaksiyon kimyası ve gerçek zamanlı PCR (Roche LightCycler480 II) ile Tablo 1'de belirtilen primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA içerisindeki istenilen mRNA karşılığının yükseltgenebilmesi için 5 µl SYBR Green Mastermix (Roche FastStart Universal SYBR Green Master Mix with Rox) 2 µl ileri, 2 µl geri primerler (her birinden 2mM) ile karıştırıldıktan sonra karışım üzerine 1 µl cDNA (1:10 oranında seyreltilmiş) eklendi. 95°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonunun ardından, 94°C'de 15 saniye denatürasyon, 58°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 30 saniye uzatma aşaması 45 kez tekrarlanırken her döngünün bağlanma aşamasından sonra floresan ışıma cihaz yardımı ile belirlendi. Her bir yükseltme eğrisi için eşik döngü sayısı (CT) değerleri hesaplanarak kullanılan standartlar ile kalibrasyon eğrileri oluşturuldu ve örneklerdeki mRNA ifadelenmesi belirlendi. Normalizasyon için internal standart olarak GAPDH primerleri kullanıldı (Tablo 2). Standart eğri yöntemine göre dokular içerisinde aranan gen ekspresyon düzeyleri GAPDH genine oranlanarak birbirleri ile karşılaştırıldı. Aynı zamanda PCR ürünlerinin ve kontaminasyonun kontrol edilmesi için ürünler üzerine melt analizi gerçekleştirildi ve ürünlerin saflıkları kontrol edildi. Herhangi bir cDNA ya da DNA içermeyen kör reaksiyon tüpleri kullanılarak genomik DNA kontaminasyonu olup olmadığı kontrol edildi.

Çizelge 3.1. Real Time-PCR Deneylerinde Kullanılan Primer Çiftler (IRS-1, IRS-2, SIRT-1, mTOR, Foxo3a, Nrf2 ve internal standart GAPDH)

Gen	İleri Primer dizi (5'→3')	Ters Primer dizi (5'→3')	Ürün (bç)
IRS-1	GCCAATCTTCATCCAGTTGC	CATCGTGAAGAAGGCATAGG	337
IRS-2	CTACCCACTGAGCCCAAGAG	CCAGGGATGAAGCAGGACTA	151
SIRT-1	CGGTCTGTCAGCATCATCTTCC	CGCCTTATCCTCTAGTTCCTGTG	136
mTOR	GCAATGGGCACGAGTTTGTT	AGTGTGTTCACCAGGCCAAA	94
Foxo3a	ATAACTTTGTGCTGCTGCCG	CAGCTACCTCGGCTCCTTC	207
Nrf2	GATTCGTGCACAGCAGCA	GCCAGCTGAACTCCTTAGAC	466
GAPDH	TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG	TCCTTGGAGGCCATGTGGGCCAT	240

3.7. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir. Deney verilerinin istatistik analizi, un-paired Student's t-testi kullanılarak yapılmış. P değeri 0,05'den küçük ise, bulgu anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

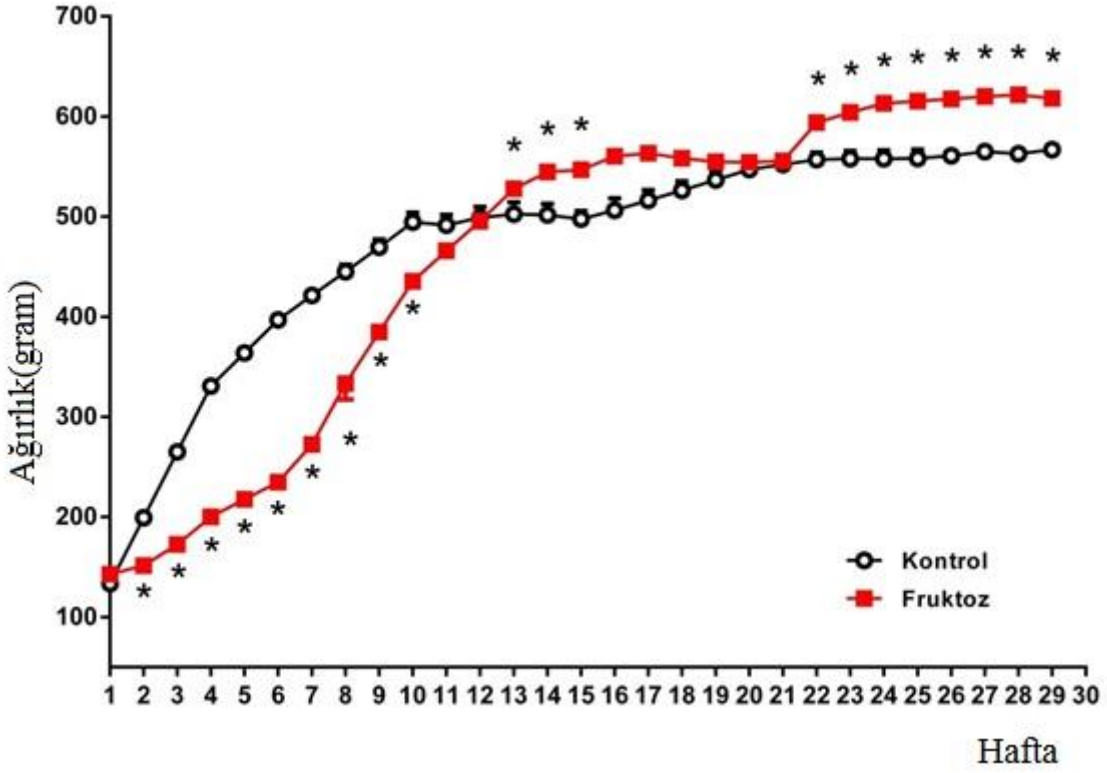
4.1. Sıçanların Ağırlıkları ile Günlük Yem, Sıvı ve Kalori Tüketimi

Sıçanların son ağırlıkları karşılaştırıldığında, fruktoz grubundaki hayvanların kontrol grubuna göre vücut ağırlıklarının değişmediği saptanmıştır. Günlük yem tüketim miktarları karşılaştırıldığında ise, kontrol grubundaki hayvanların daha fazla yem tükettiği saptanmıştır. Günlük sıvı alımları açısından yapılan değerlendirmelerde ise fruktoz grubunun kontrole göre daha fazla sıvı tükettiği saptanmıştır. Hayvanların günlük kalori alımı karşılaştırıldığında ise gruplar arasında anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Ayrıca, Çizelge 4.1'de gösterildiği üzere, hayvanların ağırlık artışı ile günlük yem, sıvı ve kalori tüketimi 30 hafta boyunca her hafta kaydedilmiştir. Bu kayıtlara ilişkin veriler Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'te görülebilir.

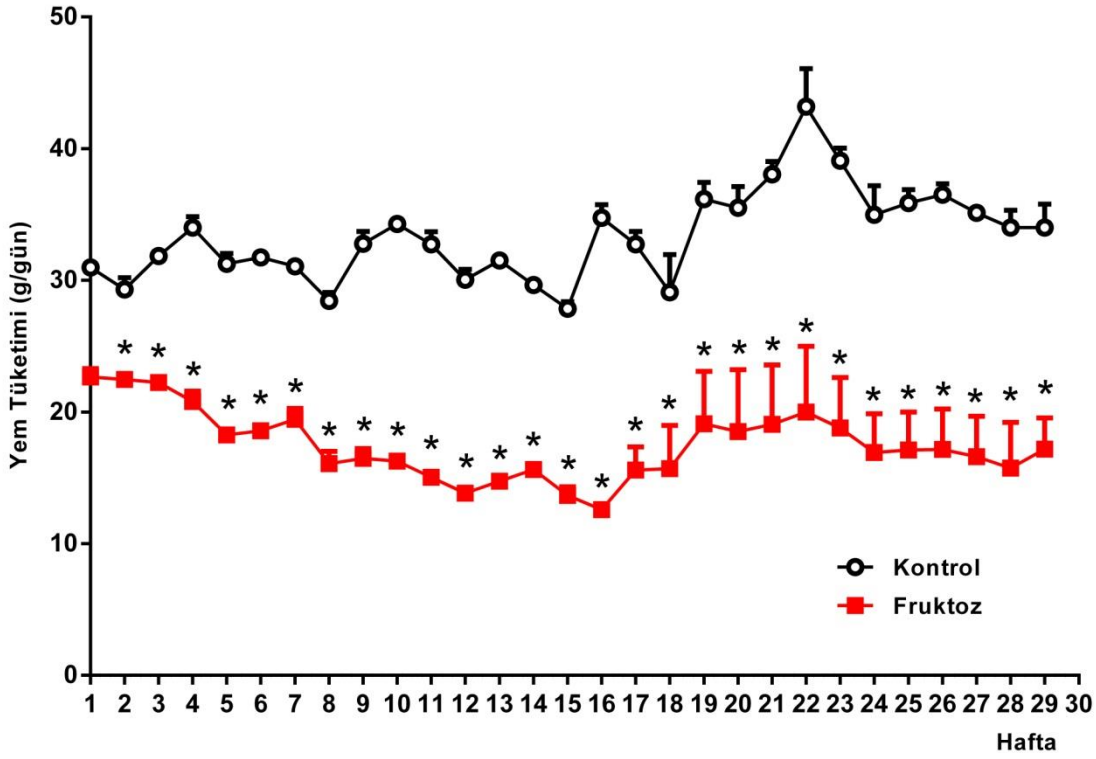
Çizelge 4.1. Sıçanların günlük yem, sıvı ve kalori tüketimi ile vücut ağırlıkları

	KONTROL	FRUKTOZ
Tüketilen Yem Miktarı (g/gün)	33.4.± 0.7	22.9 ± 1.1 *
Tüketilen Sıvı Miktarı (ml/gün)	49 ± 0.75	79.8 ± 2.4 *
Kalori Alımı (kkal)	117± 2.5	124.4 ± 4.5
İlk Ağırlık (g)	133.5 ± 1.8	141 ± 0.6
Son Ağırlık (g)	570 ± 3.2	591± 1.4
Ağırlık Farkı	436 ± 5	450 ± 13.4

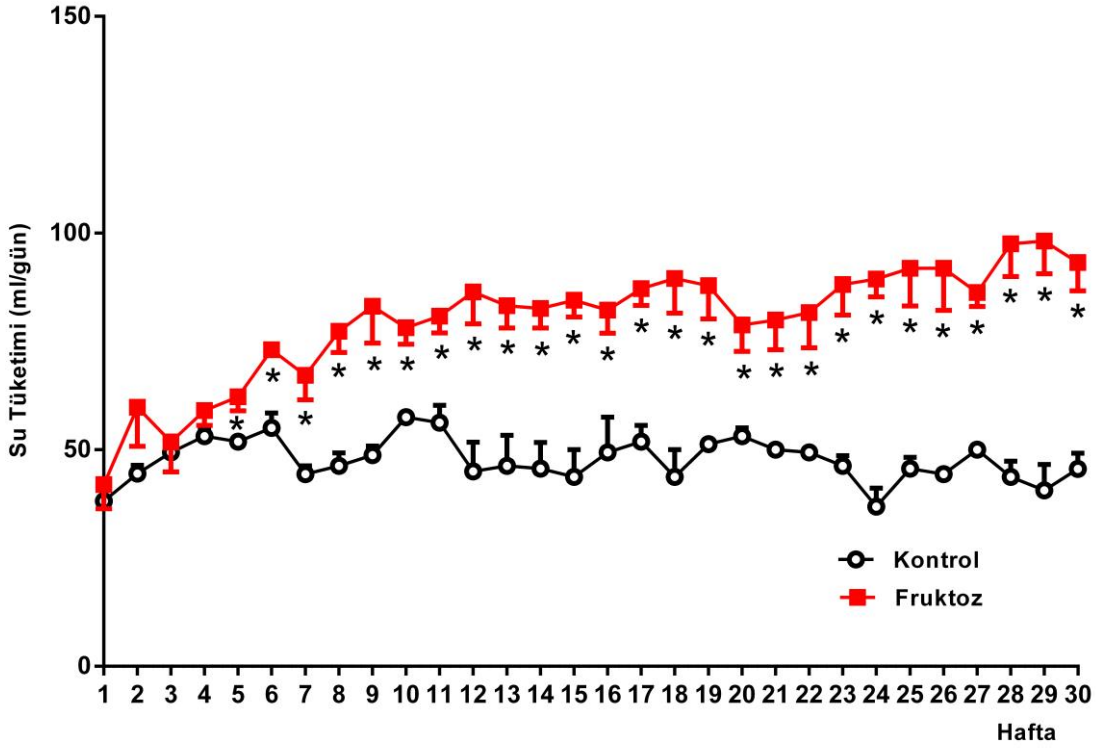
Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9, * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.1. Sıçanların haftalara göre ağırlık değişimi. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9, * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.



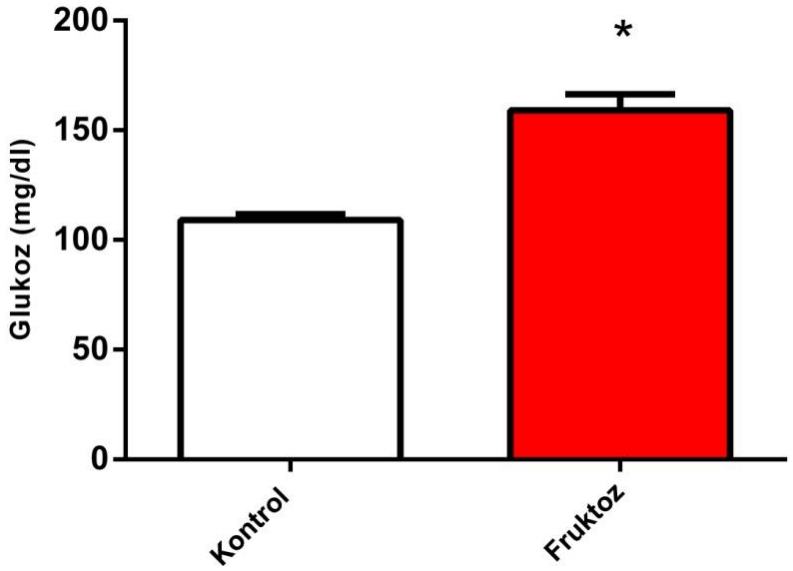
Şekil 4.2. Sıçanların 30 haftalık periyot boyunca haftada bir ölçülen günlük yem tüketimi. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9, * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.



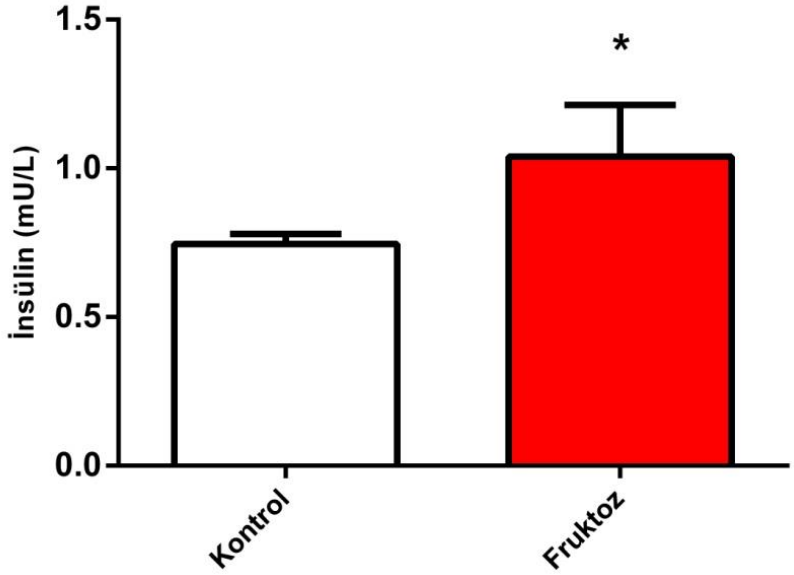
Şekil 4.3. Sıçanların 30 haftalık periyot boyunca haftada bir ölçülen günlük sıvı alımı. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9, * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir

4.2. Sıçanların Plazma Glukoz ve İnsülin Düzeyleri

Sıçanların intrakardiyak alınan kan örneklerinde açlık olmayan glukoz düzeyleri ölçülmüştür. Fruktoz tüketimi glukoz düzeyini kontrole göre anlamlı olarak artırmıştır. Grupların toplu karşılaştırılması Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Şekil 4.5'da fruktoz tüketimi plazma insülin düzeyini kontrole göre belirgin şekilde artırdığı görülmektedir.



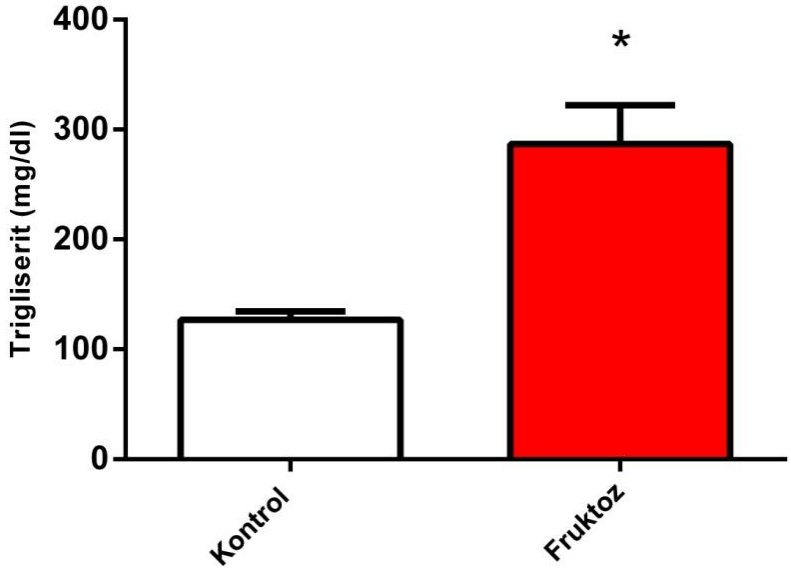
Şekil 4.4. Sıçanların kan glukoz düzeyleri. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9, * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir



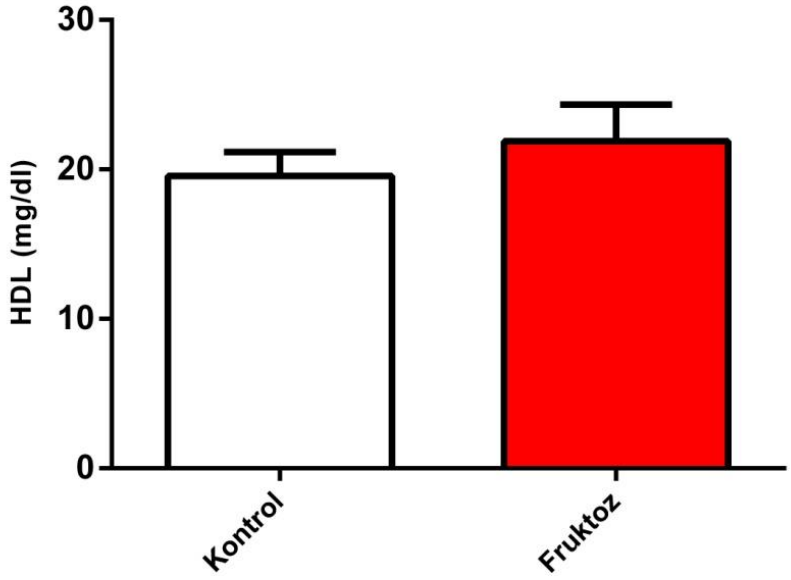
Şekil 4.5. Sıçanların plazma insülin düzeyleri. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9, * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir

4.3. Sıçanların Plazma Lipit Profili

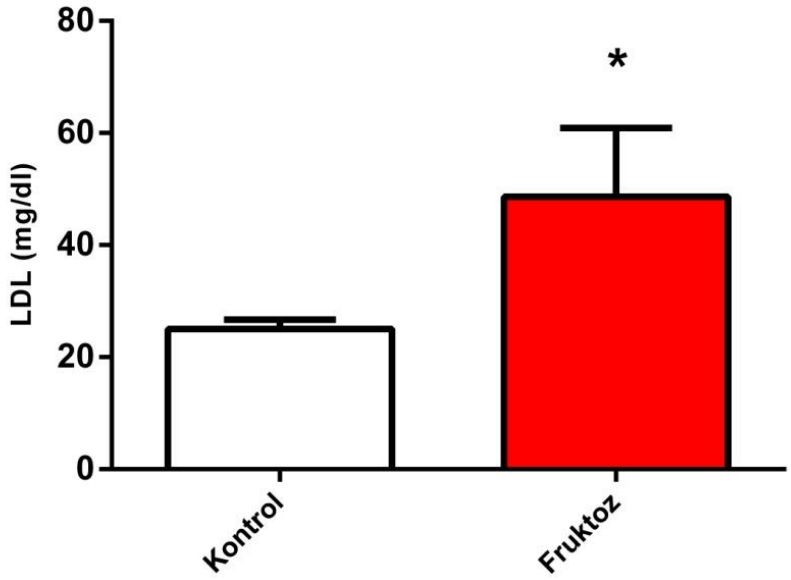
Sıçanların plazma trigliserit, HDL, LDL, VLDL ve total kolesterol düzeyleri ölçülmüştür. 30 hafta boyunca içme suyu içerisinde verilen fruktoz, sıçanların plazma trigliserit, LDL, VLDL ve total kolesterol düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak artırmıştır. Plazma HDL düzeylerinde fruktoz tüketimine bağlı herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Sonuçlara ilişkin karşılaştırmalı veriler, Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10 da gösterilmiştir.



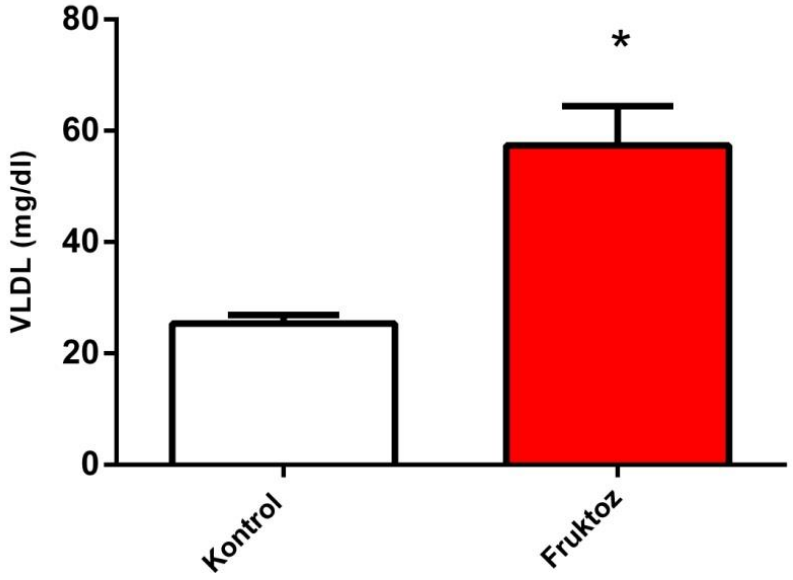
Şekil 4.6. Sıçanların plazma trigliserit düzeyleri. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9, * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir



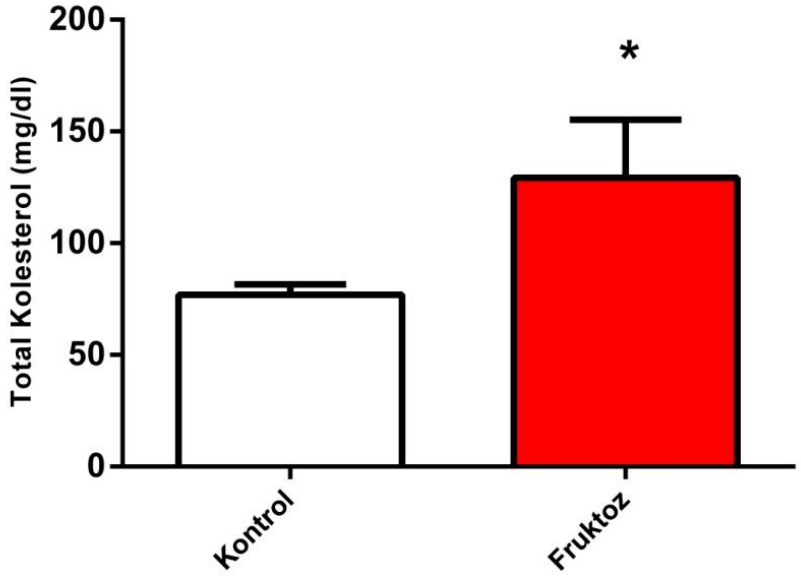
Şekil 4.7. Sıçanların plazma HDL düzeyleri. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9



Şekil 4.8. Sıçanların plazma LDL düzeyleri. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9, * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir



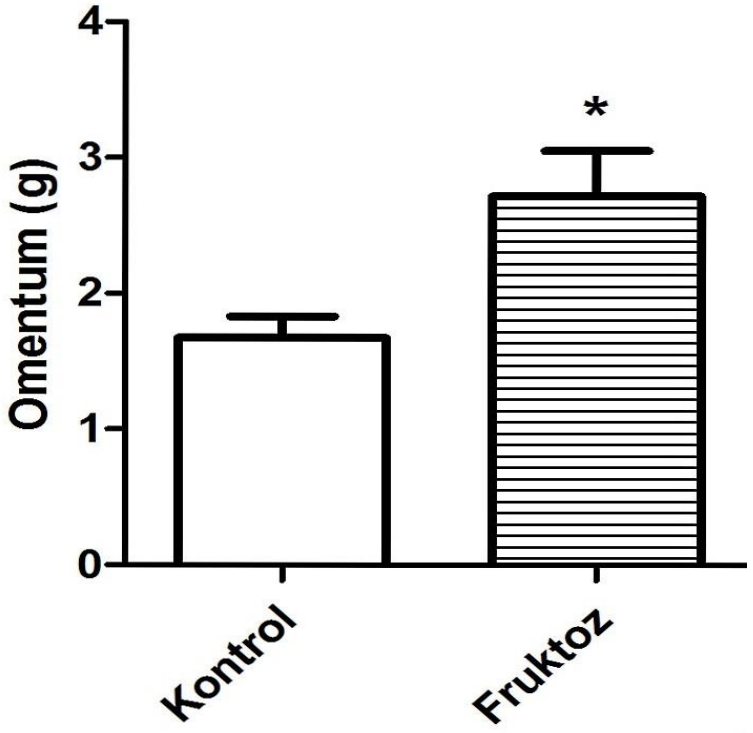
Şekil 4.9. Sıçanların plazma VLDL düzeyleri. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9, * p<0.05 kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir



Şekil 4.10. Sıçanların plazma total kolesterol düzeyleri. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9, * p<0.05 kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir

4.4. Omentum Ağırlığı

30 hafta boyunca içme suyu içerisinde %15 fruktoz tüketen sıçanların omentum ağırlıklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması şekil 4.11'de gösterilmiştir. Fruktoz tüketimi omentum ağırlığını anlamlı düzeyde artırmıştır.

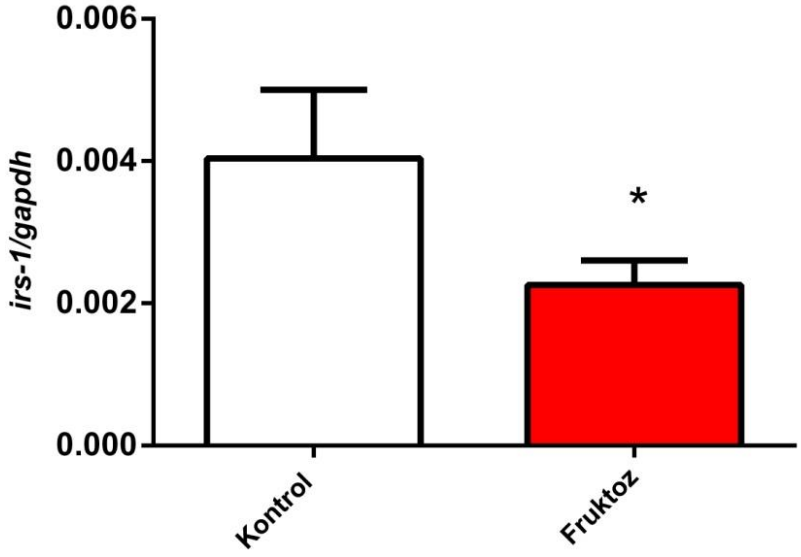


Şekil 4.11. Uzun dönem fruktoz tüketiminin omentum ağırlığına etkisi. Değerler ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. n=6-9, * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir

4.5. Real Time-PCR Yöntemiyle mRNA Ölçümü

4.5.1. Sıçanların omental adipoz dokularında IRS-1 mRNA miktarları

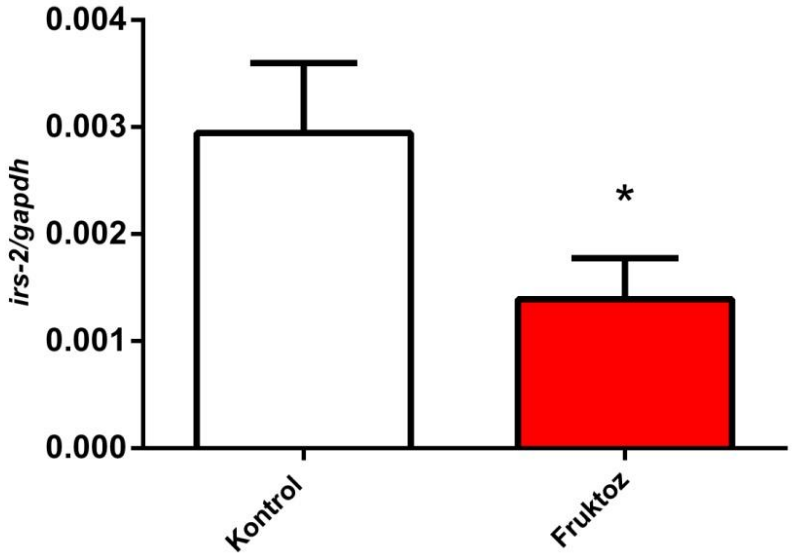
Real Time-PCR yöntemiyle sıçanların omental adipoz dokularında IRS-1 mRNA miktarları ölçülmüştür. Fruktoz tüketimi IRS-1 mRNA miktarlarını kontrole göre belirgin şekilde azaltmıştır. Grupların toplu karşılaştırılması Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen IRS-1 mRNA ekspresyonu. IRS-1 mRNA yoğunluğu GAPDH'e göre oranlandı. Her bar en az 5 sıçandan alınan adipoz doku örneklerini göstermektedir. Değerler ortalama ± Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.5.2. Sıçanların omental adipoz dokularında IRS-2 mRNA miktarları

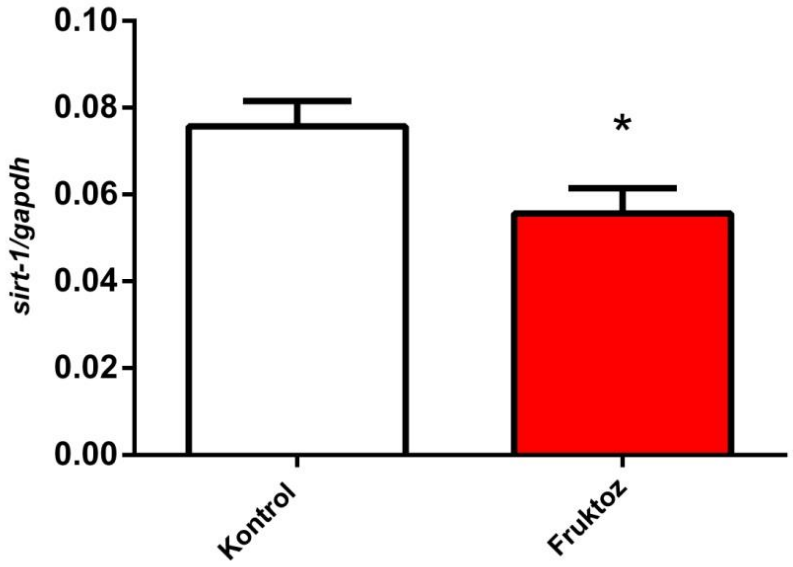
Real Time-PCR yöntemiyle sıçanların omental adipoz dokularında IRS-2 mRNA miktarları ölçülmüştür. Fruktoz tüketimi IRS-2 mRNA miktarlarını kontrole göre belirgin şekilde azaltmıştır. Grupların toplu karşılaştırılması Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen IRS-2 mRNA ekspresyonu. IRS-2 mRNA yoğunluğu GAPDH'e göre oranlandı. Her bar en az 5 sıçandan alınan adipoz doku örneklerini göstermektedir. Değerler ortalama ± Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.5.3. Sıçanların omental adipoz dokularında SIRT-1 mRNA miktarları

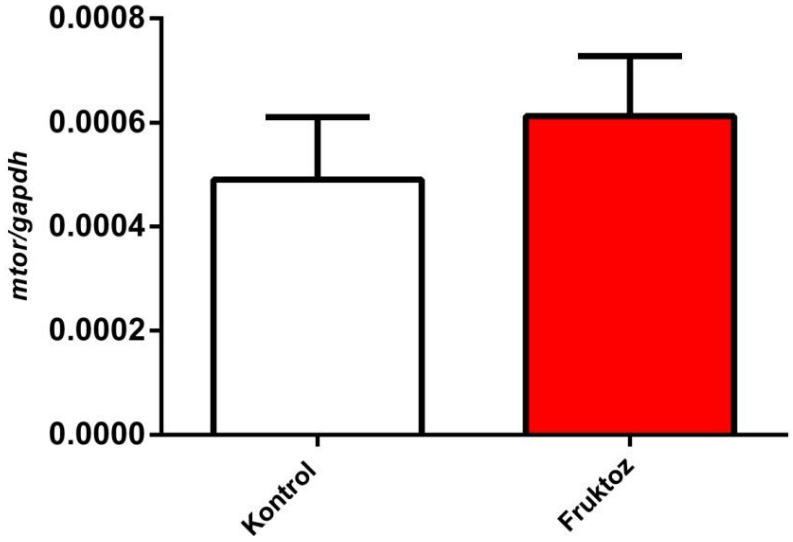
Real Time-PCR yöntemiyle sıçanların omental adipoz dokularında SIRT-1 mRNA miktarları ölçülmüştür. Fruktoz tüketimi SIRT-1 mRNA miktarlarını kontrole göre belirgin şekilde azaltmıştır. Grupların toplu karşılaştırılması Şekil 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen SIRT-1 mRNA ekspresyonu. SIRT-1 mRNA yoğunluğu GAPDH'e göre oranlandı. Her bar en az 5 sıçandan alınan adipoz doku örneklerini göstermektedir. Değerler ortalama ± Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.5.4. Sıçanların omental adipoz dokularında mTOR mRNA miktarları

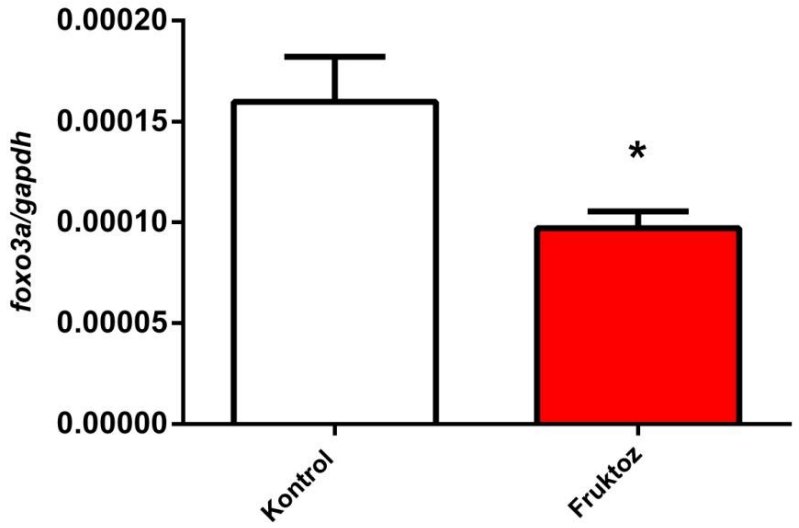
Real Time-PCR yöntemiyle sıçanların omental adipoz dokularında mTOR mRNA miktarları ölçülmüştür. Fruktoz tüketimi mTOR mRNA miktarlarını kontrole göre anlamlı ölçüde değiştirmemiştir. Grupların toplu karşılaştırılması Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen mTOR mRNA ekspresyonu. mTOR mRNA yoğunluğu GAPDH'e göre oranlandı. Her bar en az 5 sıçandan alınan adipoz doku örneklerini göstermektedir. Değerler ortalama ± Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir.

4.5.5. Sıçanların omental adipoz dokularında Foxo3a mRNA miktarları

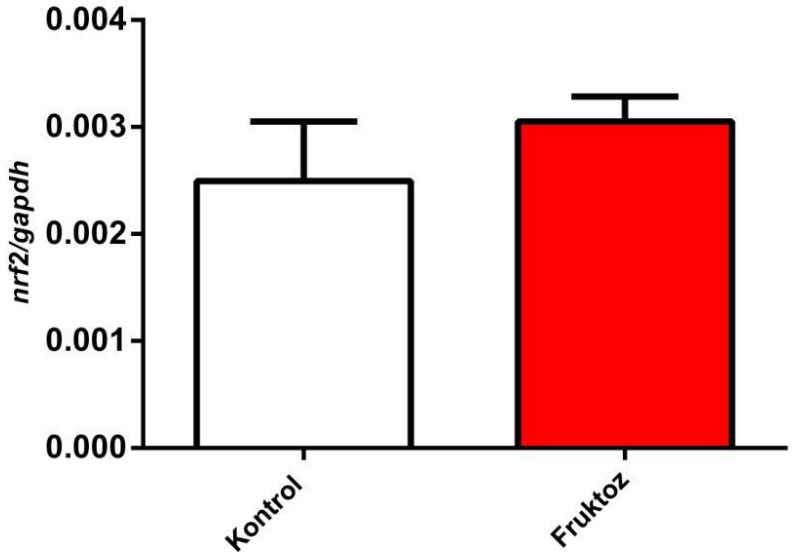
Real Time-PCR yöntemiyle sıçanların omental adipoz dokularında Foxo3a mRNA miktarları ölçülmüştür. Fruktoz tüketimi Foxo3a mRNA miktarlarını kontrole göre belirgin şekilde azaltmıştır. Grupların toplu karşılaştırılması Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen Foxo3a mRNA ekspresyonu. Foxo3a mRNA yoğunluğu GAPDH'e göre oranlandı. Her bar en az 5 sıçandan alınan adipoz doku örneklerini göstermektedir. Değerler ortalama ± Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. * $p<0.05$ kontrole göre istatistik olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.5.6. Sıçanların omental adipoz dokularında Nrf2 mRNA miktarları

Real Time-PCR yöntemiyle sıçanların omental adipoz dokularında Nrf2 mRNA miktarları ölçülmüştür. Fruktoz tüketimi Nrf2 mRNA miktarlarını kontrole göre anlamlı ölçüde değiştirmemiştir. Grupların toplu karşılaştırılması Şekil 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. Real Time-PCR yöntemi ile sıçanların omental adipoz doku örneklerinde ölçülen Nrf2 mRNA ekspresyonu. Nrf2 mRNA yoğunluğu GAPDH'e göre oranlandı. Her bar en az 5 sıçandan alınan adipoz doku örneklerini göstermektedir. Değerler ortalama ± Standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Fruktoz doğal olarak meyve ve sebzelerden elde edilen bir monosakkarittir. Günlük hayatta glukoz ile birlikte yüksek fruktoz içeren mısır şurubunun (YFMŞ) içeriğinde yer alan fruktoz, YFMŞ aracılığı ile birçok yiyecek ve içecek içerisinde tükettiğimiz bir enerji kaynağıdır [33]. Son yıllarda metabolik sendromlu ve obez hasta sayısındaki artışın, fruktoz tüketimiyle ilişkili olduğu birçok araştırma ile ifade edilmiştir [38]. Bu durum, fruktozun hücre içerisine alınmasının insülinden bağımsız bir şekilde gerçekleşmesiyle ilişkilendirilmiştir [34]. Bu nedenle, uzun süreli fruktoz tüketiminin karaciğerde yağ akümülasyonuna neden olduğu ve lipogenezi indüklediği saptanmıştır [46]. Fruktozun fruktokinaz aracılığı ile fruktoz 1,6-bifosfata dönüşerek krebs döngüsüne girmeden privuta indirgenmesi, glikojen ve serbest yağ asitlerinin oluşmasına neden olur [32]. Karaciğer ve vücudun birçok farklı kompartmanında adipoz doku kitle artışının nedeni ise, fruktozun metabolizasyonu ile ortaya çıkan yağ asitlerinin trigliserit ve apoprotein B aracılığı ile VLDL'ye dönüşmesiyle ilişkilendirilmiştir [54]. Diğer taraftan, fruktozun birçok farklı protein yapılarıyla etkileşerek ileri glikasyon ürünlerine dönüştüğü, bu ürünlerin de yaşlanmayı hızlandırdığı ileri sürülmüştür [58]. Uzun süreli fruktoz tüketiminin yukarıda ifade edilen bu olumsuz etkileriyle başta insülin direnci ve diyabet olmak üzere hipertansiyon, hipertrigliseridemi ve inflamasyon gibi birçok metabolik hastalığın patogenezinde yer aldığı ifade edilmektedir [30]. İn vivo ve in vitro çalışmalarda %5-30 fruktoz içeren içme suyu tüketen kemirgenlerde 2. haftadan itibaren metabolik sendrom oluşmaya başladığı gösterilmiştir [42]. Fruktoz tüketimi ile gelişen metabolik sendromun kardiyovasküler komplikasyonların ve diyabetteki morbidite ve mortalite için ciddi bir risk faktörü olması nedeniyle tedaviye yönelik alternatifler büyük önem arz etmektedir. Bu tez çalışması ile 30 hafta boyunca içme suyu içerisinde %15 fruktoz verilen sıçanların metabolik parametreleri ile IRS-1, IRS-2, SIRT-1, mTOR, Foxo3a ve Nrf2 mRNA ekspresyonlarındaki değişiklikleri incelemeyi amaçlamıştır. Sıçanlara verilen fruktoz oranı günlük hayatta tükettiğimiz meşrubat veya gazlı içeceklerin içeriğindeki karbonhidrat oranını (%7-15) simüle etmek için %15 olarak belirlenmiştir [94].

Sıçanların 30 hafta boyunca tükettikleri standart yem ve fruktoz miktarları ile günlük kalori alımları ve ağırlık değişimleri incelenmiştir. Çizelge 4.1.'de yer alan sonuçlara göre, fruktoz ile beslenen sıçanların günlük kalori alımında ve son ağırlıklarında kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Fruktoz tüketen sıçanların

günlük yem tüketimi azalırken, günlük sıvı alımı anlamlı olarak artmıştır. Bu değişiklik fruktoz ile elde edilen kalorinin yem tüketimini baskılamasından kaynaklanmaktadır. Benzer bir çalışmada, *LDLR−/−* farelerin 12 hafta süre ile %15 fruktoz verilmesiyle vücut ağırlıkları değişmemiştir. Fruktoz tüketen farelerin günlük sıvı tüketimlerinin anlamlı olarak arttığı, günlük kalori alımlarının ise azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada fruktoz tüketen farelerin günlük yem tüketimi anlamlı olarak azalmıştır [84]. İçme suyu içerisinde %15 fruktoz ile 16 hafta süre ile beslenen *Wistar* sıçanların vücut ağırlıklarının anlamlı olarak arttığı saptanmıştır [86]. Diğer bir çalışmada, 15 hafta süre ile %30 fruktoz tüketen *Wistar* sıçanların vücut ağırlıklarının değişmediği, günlük sıvı alımlarının kısmen arttığı, gün yem tüketimleri ve kalori alımının ise anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır [48]. İçme suyu içerisinde (%30) fruktoz diyetinin uygulandığı bu çalışmaların bulguları, bizim sonuçlarımız ile büyük ölçüde uyumluluk göstermektedir. Bununla birlikte bu tez çalışmasında deney süresinin 30 hafta olması nedeniyle, sıçanlar nispeten daha uzun süre fruktoza maruz kalmıştır.

Bu tez çalışmasında fruktoz ile beslenen sıçanların plazma glukoz, insülin, trigliserit, LDL, VLDL ve total kolesterol düzeylerinin arttığı, fakat HDL düzeylerinin değişmediği saptanmıştır. *Wistar* erkek sıçanlarda yapılan bir çalışmada, denekler %10 fruktoz ile 24 hafta boyunca beslenmiştir. Fruktoz ile beslenen sıçanların plazma glukoz ve total kolesterol düzeylerinin değişmediği, insülin ve trigliserit düzeylerinin ise anlamlı olarak arttığı saptanmıştır [77]. *Wistar* sıçanların kullanıldığı diğer bir çalışmada ise %10 fruktoz ile 20 haftalık diyet sonrası plazma glukoz ve trigliserit düzeylerinin arttığı gösterilmiştir [88]. *Sprague-Dawley* sıçanların kullanıldığı bir çalışmada, 8 hafta süre ile %20 fruktoz diyetinin plazma glukoz, insülin, trigliserit ve VLDL düzeylerini artırdığı saptanmıştır [89]. İçme suyu içerisinde %10 fruktoz ile 28 haftalık beslenmenin *Sprague-Dawley* sıçanlarda plazma glukoz, insülin ve trigliserit düzeylerini artırdığı saptanmıştır [81]. Bu tez çalışmasında, plazma parametrelerindeki değişiklikleri önceki çalışmalara göre değerlendirdiğimizde, sonuçlar büyük oranda paralellik göstermektedir. İlgili parametrelerdeki kısmi farklılıkların ise deney süresi ve fruktoz konsantrasyonundan kaynaklandığını söyleyebiliriz. *Swiss* farelere 6 hafta süre ile %20 fruktoz diyetinin plazma glukoz düzeyini değiştirmediği, fakat plazma trigliserit düzeyini artırdığı, karaciğerde yağ akümülasyonuna neden olduğu, adiposit sayısını ve büyüklüğünü artırdığı saptanmıştır. [90]. Uzun süreli fruktoz tüketimiyle fruktozun yağ asitlerine dönüşerek trigliserit, VLDL ve LDL formlarında depolandığı bilinmektedir. Sonuçlarımıza göre uzun süreli fruktoz

tüketiminin plazma lipitlerini artırdığı ve insülin direncine neden olduğu görülmektedir. Uzun süreli fruktoz tüketiminin insülin direncine neden olduğu bilinmektedir. Fruktozun bu etkisine insülin reseptör substratlarındaki duyarsızlaşma aracılık etmektedir [73]. Adipoz dokudaki insülin etkinliğindeki değişiklikler ise IRS-1 ve IRS-2 üzerinden gerçekleşmektedir [64]. Bu tez çalışmasında, fruktoz ile beslenen sıçanların adipoz doku IRS-1, IRS-2, SIRT-1 ve Foxo3a düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı, mTOR ve Nrf2 düzeylerinin ise kısmen arttığı saptanmıştır. *Wistar* sıçanlarda %10 fruktoz ile 24 haftalık diyetin ardından adipoz dokuda IRS-1 ve IRS-2 mRNA ekspresyonun arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada insülin duyarlılığının bir göstergesi olan SIRT-1 düzeyinin ise değişmediği, mTOR ve Nrf2 düzeylerinin ise arttığı saptanmıştır [63]. *Sprague-Dawley* sıçanlarda 10 hafta süreyle %10 fruktoz alan sıçanların adipoz doku IRS-1 ve IRS-2 protein ekspresyonunun kısmen azaldığı tespit edilmiştir [95]. Benzer bir çalışmada ise fruktoz tüketiminin adipoz dokuda IRS-1 mRNA ekspresyonunu artırdığı, IRS-2 düzeyini ise değiştirmediği saptanmıştır. *Sprague-Dawley* sıçanların 12 hafta boyunca fruktoz almasıyla adipoz doku Foxo3a ve SIRT-1 düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir [93]. Bu tez çalışmasına ait gen sonuçları değerlendirildiğinde insülin duyarlılığına ilişkin parametrelerden IRS-1, IRS-2 ve SIRT-1 mRNA düzeylerinin fruktoz tüketimiyle azalması literatürle kısmen uyumludur. Bu parametrelere ilişkin adipoz dokudaki mRNA düzeylerinin benzer bazı çalışmalarla farklılık göstermesi, sıçanlara uygulanan farklı diyetlerle ilişkilendirilebilir. Ayrıca bu farklılıklar, ilgili genlerin protein ve/veya fosforile protein düzeyleri arasındaki kompensasyon nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Bu açıdan, daha çok parametrenin protein ve fosfo-protein düzeyinde araştırılması daha aydınlatıcı olacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Fruktoz tüketiminin, son yıllarda artan obezite ve metabolik sendrom prevalansının nedenleri arasında olduğu bilinmektedir. Hazır gıda ve içeceklerin içeriğinde yer alan fruktozun meyve ve sebzelerin haricinde yüksek fruktoz içeren mısır şurubu ile hayatımıza girmiş ve tüketiminde dramatik bir artış yaşanmıştır. *İn vitro* ve *in vivo* çalışmalar uzun süreli fruktoz tüketiminin metabolik sendroma neden olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışması ile fruktoz tüketimine bağlı hiperlipidemi ve hiperinsülinemi geliştiği saptanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar fruktoz tüketiminin adiposit yoğunluğu, büyüklüğü ve omental adipoz doku kitle artışına neden olduğunu ileri sürmektedir. Çalışmamızda ise fruktozun adipoz doku üzerindeki bu olumsuz etkilerinin lipit akümülasyonuna neden olması ve insülin sinyal ileti mekanizmasındaki bozukluklarla ilişkili olduğunu tespit ettik.

KAYNAKLAR

1. Nesto, R.W. (2004). Correlation between cardiovascular disease and diabetes mellitus: current concepts. *The American Journal of Medicine*, 116(5), 11-22.

2. Reaven, G.M. (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, 37(12), 1595-1607.

3. Adnan, E., Rahman, IA., Faridin, HP. (2019). Relationship between insulin resistance, metabolic syndrome components and serum uric acid. *Diabetes India*, 13(3):2158-2162.

4. Hanson, R.L., Imperatore, G., Bennett, P.H. and Knowler, W.C. (2002). Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(10), 3120-3127.

5. Tappy L, Le KA. (2010). Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiology*, 90: 46-23

6. Mbata, O., El-Magd, N.F.A. and El-Remessy, A.B. (2017). Obesity, metabolic syndrome and diabetic retinopathy: Beyond hyperglycemia. *World Journal of Diabetes*, 8(7), 317.

7. Ogden, C.L., Carroll, M.D., Kit, B.K., Flegal, K.M. (2012). Prevalence of obesity in the United States,2009-2010. *NCHS Data Brief*. (82):1-8.

8. Ferder L, Ferder MD, (2010). Inserra F. The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 12(2): 105-112.

9. Gürlek A, Kayaalp SO. (2005). İnsülin, Oral Antidiyabetik İlaçlar ve Glukagon. İçinde: Kayaalp SO, editör. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji.11. Baskı Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık, 1078-1039

10. Laurence LB, John SL, Keith LP. (2006). Endocrine Pancreas and Pharmacotherapy of Diabetes Mellitus and Hypoglycemia, Physiology of Glucose Homeostasis > Pancreatic Islet Physiology and Insulin Secretion. Goodman&Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 9. Baskı. Kindle , 1633-1625

11. Reaven, G.M., Ho, H. and Hoffmann, B.B. (1989). Somatostatin inhibition of fructose-induced hypertension. *Hypertension*, 14(2), 117-120.

12. Garvey, W.T. and Birnbaum, M.J. (1993). Cellular insulin action and insulin resistance. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 7(4), 785-873.

13. Ginsberg, H.N. (2000). Insulin resistance and cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(4), 453-458.

14. Copps KD, White MF. (2012). Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2.*Diabetologia*, 55: 2565-82

15. Shepherd, P.R. and Kahn, B.B. (1999). Glucose transporters and insulin action—implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 341(4), 248-257.

16. Foukas LC, Withers DJ. Phosphoinositide signalling pathways in metabolic regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 346: 115-411.

17. Imai, Y., Philippe, N., Sesti, G., Accili, D. and Taylor, S.I. (1997). Expression of variant forms of insulin receptor substrate-1 identified in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12), 4201-4207.

18. Horio, Y., Hayashi, T., Kuno, A. and Kunimoto, R. (2011). Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease. *Clinical Science*, 121(5), 191-203.

19. Kadowaki, T., Kadowaki, H., Rechler, M.M., Serrano-Rios, M., Roth, J., Gorden, P. and Taylor, S.I. (1990). Five mutant alleles of the insulin receptor gene in patients with genetic forms of insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 86(1), 254-264.

20. Fröjdö S, Durand C, Molin L, Carey AL, et al. (2011). Phosphoinositide 3-Kinase as a Novel Functional Target for the Regulation of the Insulin Signaling Pathway by SIRT1. *Mol Cell Endocrinol*, 335: 166-176

21. Bolster, D.R., Jefferson, L.S. and Kimball, S.R. (2004). Regulation of protein synthesis associated with skeletal muscle hypertrophy by insulin-, amino acid-and exercise-induced signalling. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(2), 351-356.

22. Alessi, D.R. and Downes, C.P. (1998). The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1436(1), 151-164.

23. Taha, C., Liu, Z., Jin, J., Al-Hasani, H., Sonenberg, N. and Klip, A. (1999). Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin role of mammaliantarget of rapamycin, protein kinase B, AND phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 33085-33091.

24. Huang, H. and Tindall, D.J. (2007). Dynamic Foxo transcription factors. *Journal of Cell Science*, 120(15), 2479-2487.

25. Ho, K.K., Myatt, S.S. and Lam, E.W. (2008). Many forks in the path: cycling with FoxO. *Oncogene*, 27(16), 2300.

26. Carter, M.E. and Brunet, A. (2007). Foxo transcription factors. *Current Biology*, 17(4), 113-114.

27. Yoh, K., Itoh, K., Enomoto, A., Hirayama, A., Yamaguchi, N., Kobayashi, M., Morito, N., Koyama, A., Yamamoto, M. and Takahashi, S. (2001). Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis1. *Kidney International*, 60(4), 1343-1353.

28. Chan, K. and Kan, Y.W. (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12731-12736.

29. Yu, R., Chen, C., Mo,Y.Y., Hebbar, V., Owuor, E.D., Tan, T.H. and Kong, A.N. T. (2000). Activation of mitogen-activated protein kinase pathways induces antioxidant response element-mediated gene expression via a Nrf2-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 39907-39913.

30. Hwang, I.S., Ho, H., Hoffman, B.B. and Reaven, G.M. (1987). Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*, 10(5), 512-516.

31. Defronzo, R.A. and Ferrannini, E. (1991). Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 14(3), 173-194.

32. Lakka, H.M., Laaksonen, D.E., Lakka, T.A., Niskanen, L. K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J. and Salonen, J.T. (2002). The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *The journal of the American Medical Association*, 288(21), 2709-2716.

33. Olufadi, R. and Byrne, C.D. (2008). Clinical and laboratory diagnosis of the metabolic syndrome. *Jornal of Clinical Pathology*, 61(6):697-706.

34. Dai, S. and McNeill, J.H. (1995). Fructose-induced hypertension in rats is concentration-and duration-dependent. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 33(2), 101-107.

35. weidmann, P., Bohlen, L., and Courten, M. (1995). Insulin resistance and hyperinsulinemia in hypertension. *Journal f hypertension*, 13(2), 65-72

36. Verma, S. and McNeill, J.H. (2000). Insulin resistance and hypertension: pharmacological and mechanistic studies. *Canadian Journal of Diabetes Care*, 23(2), 23-42.

37. Defronzo, R.A. (1992). Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: a complex metabolic web. Journal of cardiovascular pharmacology, 20, S1-16. Ginsberg, H.N. (2000). Insulin resistance and cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(4), 453-458.

38. Bray, G.A., Nielsen, S.J. and Popkin, B.M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), 537-543.

39. Czech, M.P., Tencerova, M., Pedersen, D.J. and Aouadi, M. (2013). Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*, 56(5), 949-964.

40. Stanhope, K.L., Schwarz, J.M., Keim, N.L., Griffen, S.C., Bremer, A.A., Graham, J.L. and McGahan, J.P. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1322-1334.

41. Park, S.K. and Meyer, T.W. (1992). The effects of fructose feeding on glomerular structure in the rat. *Journal of the American Society of Nephrology*, 3(6), 1330-1332.

42. Pektaş, M.B., Sadi, G. and Akar, F. (2015). Long-term dietary fructose causes gender-different metabolic and vascular dysfunction in rats: modulatory effects of resveratrol. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(4), 1407-1420.

43. Tran, L.T., Yuen, V.G. and McNeill, J.H. (2009). The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 332(1-2), 145-159.

44. Lorenzo, C., Okoloise, M., Williams, K., Stern, M.P. and Haffner, S.M. (2003). The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study. *Diabetes Care*, 26(11), 3153-3159.

45. Rebollo, A., Roglans, N., Alegret, M., and Laguna, J.C. (2012). Way back for fructose and liver metabolism: bench side to molecular insights. *World Journal of Gastroenterology*, 18(45), 6552.

46. Dekker, M.J., Su,Q., Baker, C., Rutledge, A.C. and Adeli, K. (2010). Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299(5), 685-694.

47. Collison, K.S., Saleh, S.M., Bakheet, R.H., Al-Rabiah, R.K., Inglisa, L., Makhoul, N.J., Maqbool, Z.M., Zaidi, M.Z., Al-Johi, M.A., Al-Mohanna, F.A. (2009). Diabetes of the liver: the link between nonalcoholic fatty liver disease and HFCS-55. *Obesity*, 17, 2003–2013.

48. Bergheim, I., Weber, S., Vos, M., Kra'mer, S., Volynets, V., Kaserouni, S., McClain, C.J., Bischoff, S.C. (2008). Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: Role of endotoxin. *Journal of Hepatology*, 48, 983–992.

49. Duseja, A., ve Chawla, Y.K. (2014). Obesity and NAFLD: the role of bacteria and microbiota. *Clinics in Liver Disease*, 18(1), 59-71.

50. Elliott, S.S., Keim, N.L., Stern, J.S., Teff, K. and Havel, P.J. (2002). Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(5), 911-922.

51. 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. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22, 527–534.

52. Pedersen, O., Bak, J.F., Andersen, P.H., Lund, S., Moller, D.E., Flier, J.S. and Kahn, B.B. (1990). Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. *Diabetes*, 39(7), 865-870.

53. Nomura, K. and Yamanouchi, T. (2012). The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(3), 203-208.

54. Douard, V. and Ferraris, R.P. (2008). Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 295(2), 227-237.

55. Torres-Leal, F.L., Fonseca-Alaniz, M.H., Rogero, M.M., and J Tirapegui, J. (2010). The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance, *Cell Biochemistry and Function*, 28(8), 623–631,

56. Ballak, D.B., Stienstra, R., Tack, C.J., Dinarello, C.A. and van Diepen, J. A. (2015). IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine*, 75(2), 280-290.

57. Shi, H., Cave, B., Inouye, K., Bjørbæk, C., and Flier, J.S. (2006). Overespression of suppressor of cytokine signaling 3in adipose tissue causes local but not systemic insulin resistance. Diabetes, 55(3), 699–707.

58. Ma, X., Lin, L., Yue, J. (2013). Ghrelin receptor regulates HFCS induced adipose inflammation and insulin resistance. *Nutrition and Diabetes*,3(12), 99.

59. Scherer, P. E. (2006). Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes*,55(6), 1537-1545.

60. Previs, S.F., Withers, D.J., Ren, J.M., White, M.F., and Shulman, G.I. (2000). Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and Lipid Metaboloism In Vivo. *The journal of biological chemistry*, 275(50), 38990-38994.

61. Crescenzo, R., Bianco, F., Coppla, P., Mazzoli, A., Valiante, S., Liverini, G., and Lossa, S. (2014). Adipose tissue remodeling in rats exhibiting fructose-induced Obesity. *Euro Journal Of Nutrition*, 53, 413-419.

62. Rodgers, J.T., Lerin, C., Gerhart-Hines, Z. and Puigserver, P. (2008). Metabolic adaptations through the PGC - 1α and SIRT1 pathways. *FEBS Letters*, 582(1), 46-53.

63. Pektas, M.B., Koca, H.B., Sadi, G. and Akar, F. (2016). Dietary fructose activates insulin signaling and inflammation in adipose tissue: Modulatory role of resveratrol. *BioMed Research International*, 2016, 10.

64. Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A. and White, M.F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*, 352(6330), 73-77.

65. Meric-Bernstam, F. and Gonzalez-Angulo, A.M. (2009). Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 27(13), 2278.

66. Chimin, P., Andrade, M.L., Belchior, T., Paschoal, V.A., Magdalon, J., Yamashita, A.S., Castro, E., Castoldi, A., Chaves-Filho, A.B., Yoshinaga, M.Y., Miyamoto, S., Camara, N.O. and Festuccia, W.T. (2017). Adipocyte mTORC1 deficiency promotes adipose tissue inflammation and NLRP3 inflammasome activation via oxidative stress and de novo ceramide synthesis. *Journal of Lipid Research*, 58(9), 1797-1807.

67. Simonson, D. C. and Rossetti, L. (1992). *GiaccariA. International textbook of diabetes mellitus*. Chichester: John Wiley & Sons, 635-667.

68. Boden, G., Lebed, B., Schatz, M., Homko, C. and Lemieux, S. (2001). Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes*, 50(7), 1612-1617.

69. Yoshizaki, T., Milne, J.C., Imamura, T., Schenk, S., Sonoda, N., Babendure, J.L. and Olefsky, J.M. (2009). SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Molecular and Cellular Biology*, 29(5), 1363-1374.

70. Helliwell, P.A., Richardson, M., Affleck, J., Kellet,t G.L. (2000). Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes. *Biochemical Journal*, 350 (1), 163-169.

71. Muniyappa, R. and Sowers, J.R. (2013). Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 14(1), 5-12.

72. Czech, M.P., Tencerova, M., Pedersen, D.J. and Aouadi, M. (2013). Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*, 56(5), 949-964.

73. Shi, H., Cave,B., Inouye, K., Bjorbaek, C. and Flier, J.S. (2006). Overexpression of suppressor of cytokine signaling 3 in adipose tissue causes local but not systemic insulin resistance. *Diabetes*, 55(3), 699-707.

74. Ballak, D.B., Stienstra, R., Tack, C.J., Dinarello, C.A. and van Diepen, J. A. (2015). IL-1 family members in the pathogenesis and treatment of metabolic disease: focus on adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cytokine*, 75(2), 280-290.

75. De Meyts, P., Sajid, W., Palsgaard, J., Theede, A.M., Gauguin, L., Aladdin, H. and Whittaker, J. (2007). *Insulin and IGF-I receptor structure and binding mechanism, in Mechanisms of Insulin Action.* New York, NY: Springer, 1-32.

76. Syed, N.A. and Khandelwal, R.L. (2000). Reciprocal regulation of glycogen phosphorylase and glycogen synthase by insulin involving phosphatidylinositol-3 kinase and protein phosphatase-1 in HepG2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 211(1-2), 123-136.

77. Beck-Nielsen, H. (1992). *International textbook of diabetes mellitus.* Chichester: John Wiley & Sons, 531-550.

78. Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F. and Turner, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.

79. Libuda, L. and Kersting, M. (2009). Soft drinks and body weight development in childhood: is there a relationship?. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 12(6), 596-600.

80. Burgering, B.M. and Medema, R.H. (2003). Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(6), 689-701.

81. Takagawa, Y., Berger, M.E., Hori, M.T., Tuck, M.L. and Golub, M.S. (2001). Long-term fructose feeding impairs vascular relaxation in rat mesenteric arteries. *American Journal of Hypertension*, 14(8), 811-817.

82. de A. Freitas, R.R., Lopes, K.L., Carillo, B.A., Bergamaschi, C.T., Carmona, A. K., Casarini, D.E. and Dolnikoff, M.S. (2007). Sympathetic and renin-angiotensin systems contribute to increased blood pressure in sucrose-fed rats. *American Journal of Hypertension*, 20(6), 692-698.

83. Sánchez-Lozada, L.G., Tapia, E., Jiménez, A., Bautista, P., Cristóbal, M., Nepomuceno, T. and Herrera-Acosta, J. (2007). Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(1), 423-429.

84. Hutter, N., Baena, M., Sangüesa, G., Davalos, A., Latasa, M. J., Escolà-Gil, J. C., Sánchez, R.M., Roglans, Núria., Alegret, M., Laguna, J.C. (2015). Liquid fructose supplementation in LDL-R−/− mice fed a western-type diet enhances lipid burden and atherosclerosis despite identical calorie consumption. *International Journal of Cardiology, Metabolic & Endocrine*, 9, 12-21.

85. Gutiérrez-Lara, E.J., Navarrete-Vázquez, G., Sánchez-López, A. and Centurión, D. (2017). Pharmacological evaluation of metformin and N-benzylbiguanide, a novel analogue of metformin, on the vasopressor responses to adrenergic system stimulation in pithed rats with fructose-induced insulin resistance. *European Journal of Pharmacology*, 814, 313-323.

86. Gite, S.S., Yadav, S.A., Nilegaonkar, S.S. and Agte, V.V. (2017). Functional food supplements to ameliorate the secondary complications in high fructose fed diabetic rats. *Food & Function*, 8(5), 1840-1850.

87. Francisqueti, F.V., Santos, K.C., Ferron, A.J., Lo, A.T., Minatel, I.O., Campos, D.H., Ferreira, A.L. and Corrêa, C.R. (2016). Fructose: Toxic effect on cardiorenal risk factors and redox state. *SAGE Open Medicine*, 4, 1-16

88. Zemančíková, A., Török, J. (2017). Effect of perivascular adipose tissue on arterial adrenergic contractions in normotensive and hypertensive rats with high fructose intake. *Physiology Research*, 66, 537-544.

89. Yilmaz, D.C., Bircan, F.S., Pasaoglu, O.T., Turkozkan, N. (2018). The effects of resveratrol on hepatic oxidative stress in metabolic syndrome model induced by high fructose diet. *Bratisalava Medicine Journal*, 119(1), 36-40.

90. Kawasaki, T., Igarashi, K., Koeda, T., Sugimoto, K., Nakagawa, K. (2009) Rats Fed Fructose-Enriched Diets Have Characteristics of Nonalcoholic Hepatic Steatosis. J Nutr,139, 2071-2067.

91. Kawasaki, T., Igarashi, K., Koeda, T., Sugimoto, K., Nakagawa, K. (2009). Rats Fed Fructose-Enriched Diets Have Characteristics of Nonalcoholic Hepatic Steatosis. *J Nutr*, 139, 2071-2067.

92. Wang, J., Gao, H., Ke, D., Zuo, G., Yang, Y., Yamahara, J. and Li, Y. (2013). Improvement of liquid fructose-induced adipose tissue insulin resistance by ginger treatment in rats is associated with suppression of adipose macrophage-related proinflammatory cytokines. *Evid Based Complementary and Alternatenative Medicine*, 2013, 2.

93. Chen, Y.R., Lai, Y.L., Lin, S.D., Li, X.T., Fu, Y.C., Xu, W.C. (2013). SIRT1 interacts with metabolic transcriptional factors in the pancreas of insulin-resistant and calorie-restricted rats. *Molecular Biology Reports*, 40(4), 3373-80.

94. Ventura, E.E., Davis, J.N., Goran, M.I. (2011). Sugar content of popular sweetened beverages based on objective laboratory analysis: focus on fructose content. *Obesity*, 19, 868-784.

95. Jager, J., Grémeaux, T., Cormont, M., Le Marchand-Brustel, Y.and Tanti, J. F. (2007). Interleukin-1β-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology*, 148(1), 241-251.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 11/08/2014-81349

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Fatma AKAR

Araştırmacı grubu Fatma AKAR, Barbaros ÖZER, Gökhan SADİ, Birce TABAN, Sümeyra USLU, Onur Gökhan YILDIRIM, Aylin ÇETİN ve Arash Chehrehei'den oluşan, G.Ü.ET-14.054 kod numaralı ve ***"Fruktozun oluşturduğu metabolik sendromda bazı*** *Lactobacillus* ***türleri*** (*Lactobacillus kefiranofaciens, helveticus, buchneri, rhamnosus, plantarum ve casei*) ***ve kefirin insülin rezistansı, metabolik, vasküler ve karaciğer parametreleri üzerine etkilerinin incelenmesi"*** başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-14.054 and entitled ***"The investigation of effects of some Lactobacillus species*** *(Lactobacillus kefiranofaciens, helveticus, buchneri, rhamnosus, plantarum and casei)* ***and kefir on the insulin resistance, metabolic, vascular and hepatic parameters in fructose-induced metabolic syndrome"*** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63
E-Posta:hadyek@gazi.edu.tr Web Adresi:http://dhek.gazi.edu.tr

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul Belgesi

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ :23.07.2014	TOPLANTI SAYISI : 08
ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Leyla AÇIK (Başkan)	L. AÇIK
Uzman Dr.Şeyda DİKER (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	KATILAMADI
Prof.Dr.Tuncay PEKER	KATILAMADI
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER	
Prof.Dr.Esra AKKOL	
Doç.Dr.Turgay TEKİNAY	KATILAMADI
Yrd.Doç.Dr.İhsan YIKILGAN	
Yrd.Doç.Dr.Süleyman YEŞİL	
Uzm.Dr.Burcu EKİM	
Dr.Kadir BAŞAR	
Sevim ÖNCÜ ERSANLI	L. AÇIK

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : CHEHREHEI, Arash

Uyruğu : Iran

Doğum tarihi ve yeri : 08.06.1983 / İRAN

Medeni hali : Bekar

Telefon : 05349160838

e-mail : arash_che@yahoo.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Farmakoloji (Ecz.) Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Azad Üniversitesi / Veteriner Fakültesi / Maragheh	2010
Lisans	Azad Üniversitesi / Veteriner Fakültesi / Tabriz	2006

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Chehrehei, A. (2009, 4-7 October). Mediterranian summit of WPSA, Antalya-Turkey.

Chehrehei, A. (2010, 17-23 July). 16th World congress of basic and clinical Pharmacology, Copenhagen- Denmark.

Chehrehei, A. (2008, 4-5 October). Work shop on Nanosilver Disinfectant solution Kimiafam drug co, Tehran-Iran.

Hobiler

Piyano çalmak.

GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...