



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OBEZİTE, DİYABET VE ATEROSKLEROZ METABOLİZMASI
ANABİLİM DALI

**FARELERDE KAFETERYA DİYETİ
KAYNAKLI KARACİĞER HASARINA KARŞI
BERGAMOTTİN'İN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Ebru YAZICI

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE

TRABZON-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

28.06.2022
Ebru YAZICI

İthaf

Bu doktora tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan canım anneme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bana bilimsel açıdan önemli katkı sağlayan, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle her zaman bana yol gösteren, beni sürekli teşvik eden ve desteğini esirgemeyen, emekleri ve yardımları için değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye,

Doktora eğitimim boyunca her bakımdan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım başta Sayın Prof. Dr. Ahmet Alver ve Prof. Dr. Birgül KURAL olmak üzere, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Fulya BALABAN YÜCESAN ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin YAMAN'a,

Tez çalışmamda bilgileriyle bana katkı sağlayan ve yönlendiren Sayın Doç. Dr. Selim DEMİR'e,

Doktora çalışmamda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Elif ŞAHİN, Dr. Sevil KÖR ve Dr. Serap ÖZER YAMAN'a, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma ve KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Tez çalışmamda bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Esin YULUĞ ve Arş. Gör. Elif ALVUROĞLU'na,

Tezde kullanılan hayvanların teminini sağlayan ve tecrübelerinden istifade ettiğim Sayın Prof. Dr. İsmail ABİDİN ve Dr. Öğr. Üyesi Hatice KESER'e

Bugünlere gelmemi sağlayan ve daima yanımda olan canım anneme, engibeli taşlı topraklı hayatımın bir parçası olup beni her zaman anlayışla karşılayan tüm dostlarıma ve aileme, hayata yenik düştüğümü sandığım zamanlarda beni ayağa kaldıran kardeşim Eren'e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Ebru YAZICI

Bu tez çalışması KTÜ BAP TDK-2021-9315 numaralı proje bütçesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK SAYFASI

ONAY

BEYAN

İthaf

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

vi

TABLolar DİZİNİ

vii

ŞEKİLLER DİZİNİ

viii

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

ix

ÖZET

x

ABSTRACT

xi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Karaciğer

3

2.1.1. Karaciğerin Anatomik, Fizyolojik ve Histolojik Yapısı ve Fonksiyonları

3

2.2. Geçmişten Günümüze Beslenme Şekli

4

2.3. Kafeterya Diyeti

5

2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi

7

2.5. Oksidatif Stres

8

2.6. İnflamasyon

11

2.7. Bergamottin

13

3. GEREÇ ve YÖNTEM

18

3.1. Gereçler

18

3.1.1. Laboratuvarda Kullandığımız Cihaz ve Malzemeler

18

3.1.2. Kullandığımız Kitlere Ait Bilgiler

19

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

20

3.2. Yöntemler

21

3.2.1. Uygulanan Diyet Müdahalesi

21

3.2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Tasarım

22

3.2.3. Serum Örneklerinde Glukoz, Triasilgliserol, Total Kolesterol, ALT ve AST Seviyelerinin Analizi	23
3.2.4. Serum Örneklerinde İnsülin Seviyelerinin Belirlenmesi	23
3.2.5. Serum Örneklerinde Toplam Oksidan Durum Analizi	24
3.2.6. Serum Örneklerinde Toplam Antioksidan Durum Analizi	25
3.2.7. Serum Örneklerinde Oksidatif Stres İndeksi Hesaplanması	26
3.2.8. Serum Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi	26
3.2.9. Karaciğer Dokularında Homojenizasyon Aşaması	28
3.2.10. Doku Örneklerinde Protein Miktar Tayini	28
3.2.11. Doku örneklerinde GRP78, CHOP, SOD1, GPX1, TNF- α , IL-1 β , IL-4 ve IL-10 Seviyelerinin Belirlenmesi	29
3.2.11.1. ELISA Yönteminde Uygulanan Basamaklar	29
3.2.12. Doku GRP78 Seviyelerinin Belirlenmesi	30
3.2.13. Doku CHOP Seviyelerinin Belirlenmesi	30
3.2.14. Doku Örneklerinde Toplam Oksidan Durum Analizi	31
3.2.15. Doku Örneklerinde Toplam Antioksidan Durum Analizi	32
3.2.16. Doku Örneklerinde OSI Hesaplanması	33
3.2.17. Doku MDA Seviyelerinin Belirlenmesi	33
3.2.18. Doku SOD1 Seviyelerinin Belirlenmesi	35
3.2.19. Doku GPX1 Seviyelerinin Belirlenmesi	35
3.2.20. Doku TNF- α Seviyelerinin Belirlenmesi	36
3.2.21. Doku IL-1 β Seviyelerinin Belirlenmesi	37
3.2.22. Doku IL-4 Seviyelerinin Belirlenmesi	37
3.2.23. Doku IL-10 Seviyelerinin Belirlenmesi	38
3.2.24. Karaciğer indeksi Hesaplanması	39
3.3. Doku Örneklerinde Gen Ekspresyon Analizleri	39
3.3.1. Karaciğer Dokularından Total RNA İzolasyonu	39
3.3.2. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	40
3.3.3. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolü	41
3.3.4. Gen Ekspresyon Sonuçlarının Hesaplanması	45
3.4. Histolojik Analizler	45
3.4.1. Işık Mikroskopunda Görüntüleme Öncesi Dokuların Hazırlık Aşaması ve Kesitlerin Alınması	45

3.4.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi	46
3.5. İstatistiksel Analizler	46
4. BULGULAR	47
4.1. Ağırlıklar, Kilo Artışları ve Karaciğer İndeksleri	47
4.2. Biyokimyasal Bulgular	49
4.2.1. Serumda Ölçülen Rutin Biyokimyasal Parametrelerin Düzeyleri	49
4.2.2. Doku CHOP ve GRP78 Düzeyleri	52
4.2.3. Serum ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri ve Düzeyleri	54
4.2.4. Doku İnflamasyon ile Anti-İnflamasyon Parametreleri ve Düzeyleri	58
4.2.5. Doku CHOP ve GRP78 Gen Ekspresyon Düzeyleri	60
4.3. Histopatolojik Bulgular	64
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	70
6. KAYNAKLAR	94
EKLER	119
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	120
ÖZGEÇMİŞ	122

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Laboratuvarda kullandığımız cihaz ve malzemelere ait bilgiler	18
Tablo 2.	Kullandığımız kitlere ait isim, marka ve kod bilgileri	19
Tablo 3.	Çalışmada kullandığımız kimyasallara ait bilgiler	20
Tablo 4.	Besinlerin 100 g için enerji, karbohidrat, protein ve yağ içerikleri	21
Tablo 5.	Serum TOS ölçüm basamakları	24
Tablo 6.	Serum TAS ölçüm basamakları	25
Tablo 7.	Serum MDA ölçüm basamakları	27
Tablo 8.	Doku TOS ölçüm basamakları	31
Tablo 9.	Doku TAS ölçüm basamakları	32
Tablo 10.	Doku MDA ölçüm basamakları	34
Tablo 11.	cDNA sentezi için gerekli reaktifler ve kullanılan hacimler	40
Tablo 12.	RT-PCR’da kullanılan gen ve primer dizileri	41
Tablo 13.	RT-PCR aşaması için gerekli reaktifler ve kullanılan hacimler	42
Tablo 14.	Çalışmada kullandığımız RT-PCR protokolü	43
Tablo 15.	Deney gruplarının ağırlık değişimleri ortalamaları ve karaciğer indeksleri	47
Tablo 16.	Gruplara ait glukoz, TAG, T-K, ALT, AST, insülin ve HOMO-IR düzeyleri	51
Tablo 17.	Deney gruplarına ait doku örneklerinde CHOP ve GRP78 değerleri	52
Tablo 18.	Deney gruplarına ait serum ve doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri ve düzeyleri	54
Tablo 19.	Deney gruplarına ait karaciğer dokularında inflamasyon ile anti-inflamasyon parametreleri düzeyleri	58
Tablo 20.	Karaciğer dokularına ait CHOP ve GRP78 gen ekspresyonu sonuçları	60
Tablo 21.	Kafeterya gruplarında CHOP ve GRP78 gen ekspresyonlarındaki değişim	62
Tablo 22.	Karaciğer dokusu yarı-kantitatif skorlama sonuçları	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	BGM'nin kimyasal yapısı	15
Şekil 2.	Bergamottin biyosentezi	16
Şekil 3.	İnsülin seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	23
Şekil 4.	Serum MDA seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	27
Şekil 5.	Karaciğer dokusunda protein miktarlarının hesaplanmasında kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	29
Şekil 6.	GRP78 seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	30
Şekil 7.	CHOP seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	31
Şekil 8.	Doku MDA seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	34
Şekil 9.	SOD1 seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	35
Şekil 10.	GPX1 seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	36
Şekil 11.	TNF- α seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	36
Şekil 12.	IL-1 β seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	37
Şekil 13.	IL-4 seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	38
Şekil 14.	IL-10 seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi	38
Şekil 15.	Beta aktin, GRP78, CHOP ve negatif kontrol (PCR saflığında su) için amplifikasyon eğrileri	44
Şekil 16.	RT-PCR'da elde ettiğimiz erime eğrisi grafiği örneği	44
Şekil 17.	Deney gruplarında ortalama ağırlık-hafta değişim grafiği	48
Şekil 18.	Kontrol grubuna göre CHOP gen ekspresyon düzeyleri	61

Şekil 19.	Kontrol grubuna göre GRP78 gen ekspresyonu düzeyleri	61
Şekil 20.	KD+Çözücü grubuna göre kafeterya gruplarına ait CHOP gen ekspresyonu düzeyleri	63
Şekil 21.	KD+Çözücü grubuna göre kafeterya gruplarına ait GRP78 gen ekspresyonu düzeyleri	63



RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu histolojisi	64
Resim 2.	Kontrol+Çözücü grubuna ait karaciğer dokusu histolojisi	64
Resim 3.	Kontrol+0.22BGM grubuna ait karaciğer dokusu histolojisi	65
Resim 4.	KD+Çözücü grubuna ait karaciğer dokusu histolojisi	65
Resim 5.	KD+0.05BGM grubuna ait karaciğer dokusu histolojisi	66
Resim 6.	KD+0.22BGM grubuna ait karaciğer dokusu histolojisi	66
Resim 7.	Farelerde kafeterya diyeti kaynaklı karaciğer hasarına karşı bergamottinin etkilerinin incelenmesi	91

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

4-HNE	4-Hidroksinonenal
ALT	Alanin aminotransferaz
AMPK	5'-Adenozin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz
AST	Aspartat aminotransferaz
ATF-6	Activating transcription factor-6
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bisinkoninik asit
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
BGM	Bergamottin
Bim	BCL-2-etkileşimli hücre ölüm aracısı
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CHOP	C/EBP homolog proteini
CuZn-SOD	Bakır çinko süperoksit dismutaz
CYP 450	Sitokrom P450
CYP3A5	Sitokrom P450 ailesi 3 alt ailesi A üyesi 5
CYP2B6	Sitokrom P450 ailesi 2 alt aile B üyesi 6
DEPC	Dietil pirokarbonat
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOX	Doksorubisin
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ER	Endoplazmik retikulum
ERO1	Endoplazmik retikulum oksidaz 1
FeSOD	Demir süperoksit dismutaz
GADD153	DNA hasarı ile indüklenebilir gen 153
G-CSF	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
GPX	Glutasyon peroksidaz
GRP78	Glucose-regulated protein 78-kDa

GSH	Glutasyon
HCHF	Yüksek karbohidratlı yüksek yağlı diyet
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HFD	Yüksek yağlı diyet
HFFD	Yüksek yağlı-yüksek fruktozlu diyet
HOMA-IR	İnsülin direncinin homeostatik model değerlendirmesi
IFN-γ	İnterferon-gama
IL-10	İnterlökin-10
IL-1β	İnterlökin 1- β
IL-4	İnterlökin-4
IP3R	İnositol-1,4,5-trisfosfat reseptörü
IRE1	İnozitole ihtiyaç duyan protein
ip	İntroperitoneal
KD	Kafeterya diyeti
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPS	Lipopolisakkarit
MCP-1	Monosit kemotaktik protein-1
MDA	Malondialdehit
MnSOD	Manganez süperoksit dismutaz
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NAR	Naringin
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NiSOD	Nikel süperoksit dismutaz
OS	Oksidatif stres
OSI	Oksidative stres indeksi
OxLDL	Okside düşük yoğunluklu lipoprotein
PBS	Fosfat tamponu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PERK	Protein kinaz benzeri ER kinaz
PPAR-α	Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör- α
RNA	Ribonükleik asit
ROO$\bullet$	Peroksil radikali

ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	Real-Time polimeraz zincir reaksiyonu
SEM	Ortalamanın standart hatası
SOD	Süperoksit dismutaz
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
STAT3	Transkripsiyon 3'ün Sinyal transdüseri ve aktivatörü
STZ	Streptozotosin
TAA	Toplam antioksidan aktivitesi
TAC	Toplam antioksidan kapasitesi
TAG	Triaçilgliserol
TAOP	Toplam antioksidan gücü
TAS	Total antioksidan durum
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
T-K	Total kolesterol
TLR4	Toll benzeri reseptör 4
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör- α
TOS	Total oksidan durum
UPR	Katlanmamış protein cevabı
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
WD	Western diyet
XBP-1	X-box binding protein-1

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa
μ	Mikro
∞	Sonsuz
U	Ünite
&	Ve

Formüller

OH	Hidroksil
•OH	Hidroksil radikali
Ca²⁺	Kalsiyum
Cu²⁺	Bakır +2 değerlikli
Cu¹⁺	Bakır +1 değerlikli
Fe²⁺	Demir +2 değerlikli
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen peroksit
H₂SO₄	Sülfirik asit
H₃[P(W₃O₁₀)₄]xH₂O	Fosfotungstik asit
H₃PO₄	Fosforik asit
HCl	Hidroklorik asit
HO₂•	Hidroperoksil radikali
O₂	Oksijen
O₂•⁻	Süperoksit radikali

ÖZET

Farelerde Kafeterya Diyeti Kaynaklı Karaciğer Hasarına Karşı Bergamottin'in Etkilerinin İncelenmesi

Kafeterya diyeti (KD) kaynaklı endoplazmik retikulum (ER) stresi, oksidatif stres (OS) ve inflamasyon artışının karaciğer hasarına ve buna bağlı olarak çeşitli metabolik bozukluklara neden olabileceği bildirilmektedir. Bergamottin (BGM) çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilinen doğal bir furanokumarindir. Bu çalışmada, C57BL/6/J farelerde kafeterya diyetinin neden olduğu karaciğer hasarına karşı Bergamottin'in (BGM 0.05 mg/kg ve 0.22 mg/kg) olası etkilerinin biyokimyasal ve histolojik yöntemlerle ilk defa araştırılması amaçlandı. Bu deneysel çalışmada, 48 erkek fare rastgele altı gruba ayrıldı: kontrol (K), K+Çözücü, K+0.22BGM, KD+Çözücü, KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM. Serum ve doku örneklerinde malondialdehit (MDA), toplam oksidan durum (TOS), toplam antioksidan durum (TAS), serumda insülin ve karaciğer dokularında 78-kDa glukozla düzelenen protein (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP), süperoksit dismutaz1 (SOD1), glutatyon peroksidaz 1 (GPX1), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin (IL)-1 β , IL-4 ve IL-10 düzeyleri ticari ELISA kiti kullanılarak belirlendi. Karaciğer dokusunda GRP78 ve CHOP gen ekspresyonlarına bakıldı. Ayrıca karaciğer örnekleri hematoksilin&eozen boyama ile histopatolojik olarak değerlendirildi. Sonuçlar GRP78, CHOP, MDA, TOS, SOD1, GPX1, TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KD verilen grupta anlamlı düzeyde arttığını; TAS, IL-4 ve IL-10 düzeylerinin ise azaldığını ortaya koydu ($p<0.05$). BGM, KD ile artan GRP78, CHOP, MDA, TOS, SOD1, GPX1, TNF- α ve IL-1 β seviyelerini iyileştirdi ve TAS seviyelerini arttırdı. Histolojik bulgular BGM'nin KD'nin neden olduğu karaciğer hasarını iyileştirici etkilerini destekledi. Sonuçlarımız, BGM'nin ER stresi, OS ve inflamasyonla ilişkili sinyal yollarını düzenleyerek kafeterya diyeti kaynaklı karaciğer hasarını azaltıcı bir etki sağladığını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Bergamottin, ER stresi, İnflamasyon, Kafeterya diyeti, Karaciğer hasarı, Oksidatif stres

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Bergamottin Against Cafeteria Diet Induced Liver Damage in Mice

It has been reported that increased endoplasmic reticulum (ER) stress, oxidative stress and inflammation caused by cafeteria diet (KD) may bring about liver damage and accordingly various metabolic disorders. Bergamottin (BGM) is a natural furanocoumarin that known to have various biological activities. In this study, it was aimed to investigate, for the first time, reducing efficacy of Bergamottin (BGM 0.05 mg/kg and 0.22 mg/kg) against liver damage caused by cafeteria diet on C57BL6/J mice, biochemically and histologically. In this experimental study, 48 male mice were randomly divided into six groups: control (C), C+Solvent, C+0.22BGM, CD+Solvent, CD+0.05BGM, and CD+0.22BGM. In serum and tissue samples; malondialdehyde (MDA), total oxidant status (TOS), total antioxidant status (TAS), insulin in serum and 78-kDa glucose-regulated protein in liver tissues (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP), superoxide dismutase1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPX1), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-4 and IL-10 levels were determined using a commercial ELISA kit. GRP78 and CHOP gene expressions were examined in liver tissue. In addition, liver samples were showed histopathologically by hematoxylin-eosin staining. The results revealed that GRP78, CHOP, MDA, TOS, SOD1, GPX1, TNF- α and IL-1 β levels increased significantly in the KD group compared to the control group, while TAS, IL-4 and IL-10 levels decreased ($p < 0.05$). BGM improved the levels of GRP78, CHOP, MDA, TOS, SOD1, GPX1, TNF- α and IL-1 β , which increased with KD, and increased TAS levels. Histological findings supported the reducing efficacy of BGM against KD-induced liver damage. Our results showed that BGM efficacy in reducing cafeteria diet-induced liver damage by regulating signaling pathways associated with ER stress, OS, and inflammation.

Key words: Bergamottin, Cafeteria diet, ER stress, Inflammation, Liver damage, Oxidative Stress

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Vücudumuzda önemli ve en büyük iç organ olan karaciğer, metabolik, vasküler, immünolojik, salgı ve boşaltım işlevleri gibi hayati rollere sahiptir (1). Karaciğer, genetik bozukluklar, viral ve paraziter enfeksiyonlar, hepatotoksik kimyasallara uzun süre maruz kalma, ilaç kullanımı, çok fazla alkol tüketimi ve sağlıklı beslenmeye bağlı olarak meydana gelen hastalıklarla karşı karşıya kalabilir ve hasara uğrayabilir (2, 3). Bu hasar sonucunda bozulan karaciğer fonksiyonlarına bağlı olarak fibroz, siroz ve hepatoselüler karsinom gibi ölümle sonuçlanabilen hastalıklar gelişebilmektedir. Dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olan karaciğer hastalıklarına bağlı olarak her yıl yaklaşık 1 milyondan fazla kişi hayatını kaybetmektedir (4).

Oldukça lezzetli fakat kalorisi yüksek sağlıklı gıdalardan oluşan “kafeterya diyeti” (KD) kullanımı son yıllarda popüler hale gelmiştir (5). Kafeterya diyetinin karaciğer hasarına neden olduğu ve bu hasarın patofizyolojisi ile endoplazmik retikulum stresi, oksidatif stres ve inflamasyon arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmektedir (6, 7). Endoplazmik retikulum stresi meydana geldiğinde mitokondrilerde fazla miktarda reaktif oksijen türleri (ROS) üretilir (8) ve hepatositlerdeki antioksidan savunma enzim (katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz) miktarlarında değişiklikler görülür (9). Hepatositlerde meydana gelen aşırı ROS üretimi oksidan-antioksidan dengenin oksidanlar yönüne kaymasına neden olur ve bu durum oksidatif stres (OS) olarak tanımlanır. OS durumunda hücresel sinyal yolları bozulur, biyomoleküllerin işlevi ve yapısı değişir hatta hücre ölümü gerçekleşir (10). Ayrıca endoplazmik retikulum stresi ve fazla miktarda üretilen ROS pro-inflamatuvar sitokinlerin aktivasyonunu tetiklerler ve aktive olan sitokinler çeşitli yollar üzerinden inflamasyon oluşumuna ve ilerlemesine neden olurlar (11, 12).

İlaç kullanımı ve cerrahi müdahale gibi seçenekler karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılmasına rağmen klinisyenlerin güvenilir, yan etkileri düşük, ucuz maliyetli ve kolay ulaşılabilir tedavi seçeneklerine olan ihtiyaçları devam etmektedir. Son yıllarda çeşitli metabolik hastalıklara karşı koruyucu ve tedaviye yönelik çalışmalarda fitokimyasalların kullanımı büyük ilgi görmektedir. Greyfurt ve bazı narenciye meyvelerinde bulunan Bergamottin (BGM) çeşitli biyolojik aktivitelere sahip doğal bir furanokumarin olarak bildirilmektedir (13, 14). Bergamottin’in anti-kanser (anti-proliferasyon, anti-invazyon ve anti-migrasyon, vb.), anti-mikobakteriyel, ilaç biyoyararlanımında artış ve anti-obezite dahil olmak üzere çeşitli farmasötik biyoaktivitelere

sahip olduğu gösterilmiştir (15). Bu günkü bilgilerimize göre BGM'nin kafeterya diyeti kaynaklı karaciğer hasarı üzerindeki koruyucu etkilerini değerlendiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Sağlıksız beslenme şekli olan kafeterya diyeti kaynaklı hasarlara karşı karaciğer sağlığının korunması, metabolizmanın devamlılığı ve ilişkili hastalıkların önlenmesi için çok önemlidir. Bu tez çalışmasında, farelerde KD modeli oluşturmak, KD'nin neden olduğu karaciğer hasarı ile ER stresi, oksidatif stres ve inflamasyon arasındaki ilişkiyi göstermek ve ayrıca BGM'nin bu hasara karşı olası etkilerinin histolojik inceleme ve biyokimyasal analizlerle *in vivo* olarak belirlenmesi amaçlandı.



2. GENEL BİLGİ

2.1. Karaciğer

2.1.1. Karaciğerin Anatomik, Fizyolojik ve Histolojik Yapısı ve Fonksiyonları

Karaciğer insanlarda yaklaşık 1.4-1.7 kg ağırlığa sahip olan karın boşluğunun ön üçte birlik kısmını kaplayan ve vücutta deriden sonra gelen en büyük organdır (16). Karaciğer, insanlarda ve kemirgenlerde anatomik olarak iki büyük ve iki küçük olmak üzere toplam dört loba sahiptir (17). Fonksiyonuyla ilişkili olarak ise lobül olarak isimlendirilen yapısal birimlere ayrılır. Lobüllerin köşelerinde portal alan, merkezinde ise santral ven bulunan karaciğer oldukça zengin kan donanım ağına sahiptir. Dolaşımdaki mevcut kan, hepatik arterin interlobüler dalları (1/4'ü) ve sinüzoidlere açılan hepatik portal ven (3/4'ü) yoluyla karaciğere gelir (18). Karaciğer dokusu embriyolojik kökenleri farklılık gösteren çeşitli hücre tiplerinden oluşur. Karaciğer hücreleri, karaciğerin fonksiyonel yapısal birimi olan lobül etrafında organize halde bulunurlar ve hepsinin karaciğer fonksiyonunun düzenli çalışmasında ayrı görevleri vardır (19).

Karaciğer yapısal ve işlevsel olarak heterojen ve karmaşık bir yapıya sahiptir. Bununla birlikte sayısız fizyolojik süreç için de vücutta bulunan en önemli organlardan biridir ve fonksiyonları bir organizmanın yaşamı boyunca devam eder (19). Rejenerasyon yeteneği, plazma proteinleri üretimi, vitamin ve minerallerin depolanması, ilaç ve zararlı maddelerin detoksifikasyonu, safra ve bilirubin üretimi gibi metabolik homeostazda merkezi bir rol oynamasının dışında karaciğer; karbohidratların, proteinlerin ve lipidlerin metabolizması gibi çok sayıda işlevin gerçekleştirildiği önemli bir merkezdir (20).

Karaciğer karbohidrat ve lipid metabolizması gibi birçok metabolik yolak üzerinde önemli rollere sahiptir (21). Normal fizyolojik koşullar altında karaciğer lipidler için bir depo görevi görmez. Bu yüzden karaciğerdeki trigliserit konsantrasyonu düşük seviyededir. Hem trigliseritlerin hem de yağ asitlerinin karaciğere giriş-çıkışı beslenme sonrası ve açlık dönemlerinde beslenmeye yanıt olarak artar (22). Açlık koşulları altında, yağ dokusundan salınan yağ asitleri karaciğere geri dönerek trigliseritler ile birleştirilir ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL) şeklinde paketlenerek plazmaya salınır. Ancak metabolik bir hastalık durumunda lipid alımı ve uzaklaştırılması arasındaki bu denge bozulur, hepatik trigliserit konsantrasyonu artar ve ektopik lipid birikimi oluşur. Lipidlerin hepatositlerde çoğunlukla trigliseritler şeklinde birikimi karaciğeri hipertrofiye ve oksidatif strese yatkın hale getirir. Bu durum karaciğer hasarının gelişmesinde sorumlu olan ön koşullardan

birisidir (22-24). Karaciğer beslenme veya açlık dönemlerinde çeşitli metabolik yollar aracılığıyla sistemik glukoz homeostazının düzenlenmesinde ve metabolizmanın devamlılığının sağlanmasında da merkezi bir rol oynar (25). Karaciğer glukozun vücutta bol miktarda bulunduğu tokluk sonrası dönemde glukozu glikojen şeklinde depolar ve kısa süreli açlık dönemlerinde bu glikojenin yıkılmasını sağlayarak hızlı bir şekilde kana verir (2).

Genetik yatkınlık, ciddi hasarlar, viral enfeksiyonlar, toksik kimyasallara sürekli maruz kalma ve sağlıksız diyet tüketimi (kalorisi yüksek) gibi çeşitli koşullar altında karaciğerde fibroz, siroz ve hepatoselüler karsinom dahil olmak üzere çeşitli dejeneratif karaciğer hastalıkları meydana gelir (2). Günümüz modern yaşam tarzında doymuş yağ asitleri, trans yağlar, işlenmiş kırmızı et ve et ürünleri gibi diyetle alınan yağlarda artış, fast food tarzı yiyeceklerin sık tüketimi ve basit şekerlerden oluşan kalorili diyetler beslenme alışkanlıklarındaki sağlıksız ve önemli değişiklikleri yansıtmaktadır. Yapılan çalışmalar bu sağlıksız beslenme alışkanlıklarının hiperkolesterolemi de dahil olmak üzere çeşitli metabolik bozukluklara neden olduğunu ve karaciğer üzerinde zararlı etkiler oluşturduğunu göstermiştir (24, 26).

2.2. Geçmişten Günümüze Beslenme Şekli

Sağlıklı bir diyet, vücudun enerji ve fizyolojik ihtiyaçlarını karşılamak için mikro-makro besin ve suyun yeterli oranlarda tüketildiği bir diyettir. Makrobesinler (karbohidratlar, yağlar ve proteinler) organizmanın günlük ihtiyaçlarının karşılanması ve yaşamın devamlılığı için elzem olan yapı taşlarını ve hücresel süreçler için gereken enerjiyi sağlarken; mikro besinler normal büyüme, gelişme, metabolizma ve fizyolojik işlevler için gereklidir (27, 28).

Evcilleşme sürecine bakıldığında insanların ilk zamanlarda toplayıcılığa dayanan bir beslenme kültürüne sahip oldukları görülmektedir. Toplayıcılıkta insanlar bulundukları bölgelerdeki bitki kökleri, yağlı tohumlar, meyve, sebze gibi genelde bitkisel kökenli ve karbohidrat ağırlıklı besinleri tüketmekteydiler. Paleolitik çağdan sonra çeşitli aletlerinde kullanılması ile birlikte avcılık gelişmiş ve beslenmeye büyük oranlarda et tüketimi girmiştir (29). Neolitik çağda insanlar yerleşik hayata geçmiş ve tarım yapılmaya başlanmıştır. Hayvanların da evcilleştirilmesiyle dengeli ve sağlıklı beslenme için gerekli olan süt ve süttten elde edilen ürünler tüketilmiştir (30, 31). İnsanların çağlar boyunca çeşitli gıda kaynaklarını elde etmek için ise farklı yöntemler geliştirdikleri ve gıdalara erişim için kolaylıklar sağlayacak çözümler ürettikleri görülmektedir. Tarım ve yiyecek sektörlerinin

gelişimi ve makineleşmenin yaygınlaşması, sanayi devriminden sonra hem gıda üretiminde fabrikalaşmanın önünün açılması hem de yiyecek taşımacılığının artması ve teknolojik ilerlemeler gıda arzında maaliyeti önemli ölçüde azaltmış ve bulunabilirliği artırmıştır. Bu gelişmeleri takiben yoğun kalori içeren ürünlerin üretimi ve tüketiminde hızlı bir artış olduğu ve hazır yiyecek/fast food kültürünün oluştuğu görülmektedir. Günümüzde ise tüm dünyada yaygın olarak görülen, alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olmasıyla karakterize dengesiz bir beslenme şekli, fiziksel aktivitenin yetersiz veya hiç olmadığı yeni bir yaşam tarzı ve alışkanlıkları ortaya çıkmıştır (32, 33). Paketli gıda tüketiminin artması, sıklıkla tüketilen abur cubur tarzı yiyecekler, evde ve restoranlarda çok büyük porsiyonların tercih edilmesi, fazla yağlı, tuzlu, şekerli fakat düşük lifli oldukça kalorili gıdaların sık tüketimi, gazlı ve şekerli içecekler, bireylerin öğünlerini geçiştirmek için sağlıklı yiyeceklerden ziyade kalorisi yüksek fast food tarzı yiyeceklere yönelmesi ve gıdaları lezzetlendirmek amacıyla katkı maddelerinin kullanımının yaygınlaşması değişen diyet davranışları arasında yer almaktadır (34-36).

İnsanlık tarihinin son 200 yılındaki bu değişimler aşırı kilo alınımına, besin ve enerji metabolizmasında patolojik değişikliklere, bağışıklık sisteminin ve normal fizyolojik sürecin bozulmasına bağlı olarak karaciğer hasarını da içeren metabolik hastalıkların daha fazla görülmesine yol açmıştır (37).

2.3. Kafeterya Diyeti

Yeni tanı ve tedavi yöntemlerinin araştırılmasında deney hayvanları kullanımı oldukça yaygındır. Kemirgenler; üremelerinin ve bakımlarının kolay olması, bir batında kısa sürede çok fazla yavru elde edilebilmesi, insanlarda izlenmesi zor olan fonksiyonel, biyokimyasal, morfolojik ve histolojik değişikliklerin daha iyi takip edilebilmesi, minimum dezavantajlara sahip olmaları ve ayrıca ekonomik açıdan uygun olmaları nedeniyle diğer deney hayvanlarına göre daha çok tercih edilmektedirler. Kemirgenler arasında ise insanlardakine benzer tat duyusu, sinir ve sindirim sistemine sahip olmaları sebebiyle de en çok fareler tercih edilmektedir (38-40).

İnsanlarda sık görülen metabolik hastalıkların genetik müdahalelerle veya çeşitli diyetler kullanılarak kemirgenlerde taklit edilmesi mümkündür. Fakat diyet kullanılarak oluşturulan modellerin insanlarda görülen metabolik hastalıklara daha iyi benzetildiği bildirilmektedir (41). Metabolik hastalıklarla ilgili yapılan çalışmalarda günümüzde olduğu gibi geçmişte de çeşitli diyet modellerinin kullanıldığı görülmektedir. 1970’li yıllardan sonra

çalışmalarda doymuş yağ asitleri, basit karbohidratlar ve sodyumdan zengin; mikro besin öğeleri açısından fakir olan batı tarzı diyet şeklini en iyi yansıtan **“Kafeterya Diyeti”**’nin (KD) de uygulandığı görölmektedir (42). Kafeterya diyeti, insanlar tarafından tüketilen yüksek enerjili, fazla yağlı ve karbohidratlı fakat mikro besin öğeleri ve posa yönünden yetersiz yiyeceklerin (kek, kurabiye, çikolata, cips vb) deney hayvanlarının tükettiği yemler ile karıştırılmasıyla elde edilir. KD batı tarzı diyetle benzediği için, “Abur Cubur Diyeti”, "Süpermarket Diyeti" veya "Batı Diyeti" olarak da isimlendirilmektedir (5, 43, 44). KD uygulama süresi uygulama şekli, uygulanan hayvanın yaşı ve oluşturulmak istenilen modele bağlı olarak 12-16 hafta arasında değişmektedir (7).

Kafeterya diyetinde sadece fazla yağlı veya şekerli besinleri kullanmanın yeterli olmayacağı bildirilmektedir. İyi bir KD oluşturmak için; lezzetli, tuzlu ve tatlı besinlerin, yumuşak/sert/çıtır yapıda gıdaların ve farklı besin çeşitlerinin kullanılması önerilmektedir. Ayrıca sağlıksız beslenen insanlar sadece abur cubur veya aşırı işlenmiş gıdaları tüketmezler. Bu nedenle KD hazırlanırken tüm besin öğelerini karşılamak adına oluşturulacak diyetin laboratuvar tipi kemirgen yemi ile karıştırılarak verilmesi gerektiği önerilmektedir (45). Yapılan alışmalar kemirgenlerin standart laboratuvar yemlerine kıyasla KD’yi daha lezzetli bulduklarını ve daha çok tercih ettiklerini göstermiştir (46).

2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER) protein sentezi, proteinlerin doğru katlanması ve transportu, kalsiyum (Ca^{2+}) depolanması ve lipid metabolizması gibi hücresel işlemlerde etkin ve önemli rol oynayan ökaryotik hücreler için benzersiz oldukça iyi yapılandırılmış bir organeldir (47). Hipoksi, serbest radikallere maruz kalma, nörodejenerasyon, viral enfeksiyonlar, glikozilasyon ürünlerinin artması, glukoz yetersizliği ve anormal Ca^{2+} regölasyonu gibi çeşitli fizyolojik veya patolojik stres faktörleri ER lümeninde katlanmasını tamamlamamış veya hatalı katlanmış proteinlerin birikmesine ve ER’nin fonksiyonlarının bozulmasına neden olurlar. ER’nin proteinleri katlama yeteneği ile işlenmiş protein mevcudiyeti arasında dengenin yanlış katlanmış yahut katlanmamış protein yığılımı ile neticelenmesi endoplazmik retikulum stresi olarak tanımlanmaktadır (48).

Katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlere karşı tepki meydana getirerek endoplazmik retikulumdaki bu değişiklik eski haline döndürölebilir (47). Hücre içerisinde ER stresi meydana geldikten sonra hücre, hayati fonksiyonlarını devam ettirebilmek ve toksik protein bileşenlerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak adına çeşitli sinyal yolları

ile oluşan, katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak da bilinen mekanizmayı aktive eder (49). UPR mekanizmasının temel prensibi, protein katlandırma hızının arttırılmasıyla ER lümeninde biriken katlanamayan protein miktarının azaltılarak dolaylı yoldan ER stresinin ortadan kaldırılmasıdır.

Endoplazmik retikulum lümeninde UPR'nin aktive edilmesi için iki sarmallı RNA tarafından aktiveleşebilen protein kinaz benzeri ER kinaz (PERK), Activating transcription factor (ATF)-6 ve inozitole ihtiyaç duyan protein (IRE)-1 olarak bilinen üç ayrı transmembran proteini bulunur (50). Bunlar protein katlanması, işlenmesi ve yıkılması, hasarlı hücrelerin temizlenmesi, apoptozis, redoks dengesi, lipid ve aminoasit biyosentezi hedef genlerinin transkripsiyonunu uyararak hücreyel yanıt oluştururlar (51). ATF-6, PERK ve IRE-1, ısı-şok protein (HSP) familyasından, 78 kDa'luk glukoz ile düzenlenen protein (GRP78) olarak da bilinen protein ile beraber inaktif halde bulunurlar (48, 52). Normal şartlarda GRP78 bu üç proteinin luminal kısımlarına bağlı halde bulunur ve aktivitelerini baskılar (50). Stres şartları altında GRP78, bu proteinlerinden ayrılır ve katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerle birleşmek üzere ER lümenine girerek şaperon görevi görür (53). PERK, dimerizasyon ve otofosforilasyon ile kinaz aktivitesi göstererek ökaryotik translasyon başlatıcı faktör (eIF) 2'nin α alt birimi'ni fosforiller ve bu şekilde genel protein sentezinin azaltılmasında faaliyet gösterir. IRE-1'in aktiveleşmesiyle endoribonükleaz aktive olur ve X-box binding protein (XBP)-1 üzerinden şaperon ve ubiquitin-proteazom sistemi ile ilişkili proteinlerin sentezi artırılır. GRP78'in ATF-6'dan ayrılması ile ATF-6 golgiye yönlendirilerek burada site-1 ve 2 proteazlar aracılığıyla kesime uğrarayarak aktiveleştirilir ve şaperonların sentezinin artması sağlanır (54, 55). Literatüre bakıldığında GRP78'in ER stresinin başlamasında adeta bir anahtar regülatör olarak gösterildiği ve 'ER stresinde biyobelirteç' şeklinde kabul edilebileceği bildirilmektedir (56-58).

Endoplazmik retikulum stresi altında GRP78, proteinlerin düzgün katlanmalarını kolaylaştırarak hücrenin hayatta kalmasında önemli bir rol oynar. ER stresinin hala devam etmesi durumunda DNA hasarı ile indüklenebilir gen 153 (GADD153) olarak da bilinen C/EBP homolog proteinin (CHOP) ekspresyonu hızla artar ve hücrenin apoptoz ile ortadan kaldırılma sinyalizasyonunu aktiveleştirir (59-61). CHOP'un proapoptotik rolü, moleküler mekanizma ile bazı hedef genlerin transkripsiyonel olarak düzenlenmesidir. CHOP B-cell lymphoma 2 protein (Bcl-2) ekspresyonunun doğrudan inhibisyonu ve BCL-2-etkileşimli hücre ölüm aracısı (Bim), Bcl-2-associated X protein (Bax) gibi proapoptotik proteinleri

kodlayan mRNA'ların translasyonunun indüksiyonunu teşvik ederek apoptoza yol açan değişikliklere neden olur (62). CHOP'un bir diğer etki yolu, ER'nin oksidatif şartlarının düzenlenmesidir. CHOP'un artan ekspresyonu ER'nin luminal proteini olan Endoplazmik retikulum oksidaz (ERO) 1 α 'nın indüksiyonuna neden olur (63). CHOP'un indüksiyonu ile aktive olan ERO1 α , ER stresi esnasında, ER'de meydana gelen ROS artışına neden olur (64). ER lümenindeki yüksek ROS konsantrasyonu, inositol-1,4,5-trisfosfat reseptörünü (IP3R) aktive ederek kalsiyum iyonlarının sitozole girmesine izin verir. Sitoplazmik kalsiyum artışı çeşitli kinazları aktive ederek ROS'un daha fazla üretimine neden olur. Sonuç olarak kalsiyum salınımı hücreleri apoptoza karşı açık hale getirir (65). Ayrıca fazla miktarda karbohidrat tüketimi azalmış glukoz alımı, glukoneogenezin, hepatik glukoz çıkışının ve de novo trigliserit sentezinin artışına neden olur. Bu nedenle fazla karbohidrat tüketiminin ER stresi ve karaciğerde inflamasyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (66).

2.5. Oksidatif Stres

Serbest radikaller, dış kısımlarında mevcut olan orbitallerinde ortaklanmamış elektronu bulunan, güçlü enerjiye sahip atom veya moleküllerdir. Normal fizyolojik metabolizma sırasında veya patolojik durumlarda yan ürün olarak mitokondri gibi birçok organelde üretilirler (67-69). Serbest radikaller eşleşmemiş elektronlara sahip olmalarından dolayı oldukça reaktif, kararsız ve kısa ömürlüdürler (70). Bu oldukça reaktif moleküller temas ettikleri moleküllerden elektronları yakalama yeteneğine sahiptirler ve böylece lipidler, proteinler ve DNA üzerinde çeşitli hasarlara neden olurlar (71, 72). Serbest radikallerin biyolojik ortamlardaki türlerinden biri olan reaktif oksijen türleri (ROS) son derece reaktif serbest radikaller ya da hücrede bu oksijen serbest radikallerine dönüşen oksijen içeren bileşiklerdir (73). Yaygın ROS'lardan bazıları; hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon, süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoksil ($HO_2^{\bullet}$), peroksil ($ROO^{\bullet}$) ve hidroksil radikalidir ($^{\bullet}OH$) (74). Normal fizyolojik süreçler sırasında üretilen ROS'lar, hücre sinyalizasyonunda, immün sistemde ve doku homeostazında önemli rol oynarlar (75). Ek olarak makrofaj ve nötrofil seviyelerinde sitokrom P450 (CYP450) enzimleri aracılığıyla karaciğerdeki endoplazmik retikulum tarafından da üretilirler (76). ROS'lar hücrelerin lipid, protein ve DNA gibi önemli yapılarına etki etmelerine rağmen en çok lipidleri etkilerler. Membran lipidleri, özellikle kolesterol ve çoklu doymamış yağ asitleri serbest radikaller tarafından en çok oksidasyona uğratılan lipidlerdir. Lipid peroksidasyonu; serbest radikaller tarafından başlatılan, moleküler oksijenin de reaksiyona dahil olması ile devam eden, çeşitli lipid hidroperoksitlerinin meydana geldiği ve böylece membran lipid yapısının bozulduğu

kimyasal bir işlemdir (77). Membranın peroksidasyonu ile membran geçirgenliği değişir, membran reseptörleri işlevsizliğe uğrar, membrana bağlı enzimlerin aktivitesinde ve akışkanlığında azalma görülür ve böylece hücrenin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü bozulur. Ayrıca lipid peroksidasyonu sonucu oluşan son ürünler [(malondialdehit ve 4-Hidroksinonenal (4-HNE)] DNA ve proteinlerde oluşan hasardan sorumludurlar (78).

Oksidatif stres ilk kez Helmut Sies tarafından biyolojik sistemlere zarar verebilecek oksidan üretimi ile bunlara karşı koruyucu etkiye sahip antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmıştır (79, 80). Oksidatif stres enzimler, nükleik asit, membran lipidleri ve yapısal proteinler gibi moleküller üzerinde olumsuz etkilere sahiptir ve bu moleküllerde hasar oluşturur (81). Bu hasarlar kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve karaciğer hastalıkları gibi birçok patolojik hastalıkla sonuçlanabilmektedir (82). Metabolik hastalıklarda, β -oksidasyon için substratların artması ve serbest radikal üretimini destekleyen mitokondriyal solunum zinciri boyunca aşırı elektron akışı, hepatositlerdeki elektron taşıma zincirinde hafif düzeyde işlevsizliğe yol açar. Böylece genel redoks dengesinde kayma görülür ve yağ dolu hepatositlerde prooksidan bir durum gelişir (83).

Organizmalarda devamlı olarak meydana gelen serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltacak ya da ortadan kaldıracak çeşitli sistemler mevcuttur. Çünkü vücutta prooksidan-antioksidan dengenin sağlanması büyük önem arz etmektedir (84). Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı lipid, protein ve DNA gibi bileşiklerini koruyan, ilgili substratların istenmeyen oksidasyonunu önleyebilen yahut erteleyebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya da antioksidan savunma adı verilir (85). Oksidatif stres sonucu oluşan hasara bağlı olarak hücre içi ve dışı savunma mekanizmaları azalır veya etkisiz hale gelir. Antioksidanlar farklı mekanizmalar aracılığıyla etkilerini göstererek bunu engellemeye çalışırlar (84). Hücrenin savunma mekanizmalarının temel bölümünü oluşturan doğal antioksidanlar endojen veya ekzojen olabilirler. Endojen antioksidanlar enzimatik olmayan (glutasyon, alfa-lipoik asit, koenzim Q, ferritin, ürik asit, bilirubin ve albümin) ve enzimatik olan (süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon peroksidaz) antioksidanlar olarak sınıflandırılırlar (86).

Süperoksit dismutazlar $O_2^{\bullet-}$ 'nin H_2O_2 ve O_2 'ye dönüşümünü sağlayan metalloenzim grubudur. Çoğu prokaryotik ve bazı ökaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunur. SOD aktivitesi için bir metal kofaktör gerekir. Kofaktör olarak gerekli olan metal iyonunun türüne bağlı olarak SOD enzimi dört farklı tipe ayrılır: bakır-çinko SOD (CuZn-SOD, SOD1),

manganez SOD (MnSOD, SOD2), demir SOD (FeSOD) ve nikel SOD (NiSOD). Reaktif oksijen türlerinin aracılık ettiği hasara karşı ilk savunma hattında yer alan SOD enzimlerinin, oksidatif strese bağlı hastalıkların tedavisinde de anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir (87).

İlk defa 1957 yılında varlığı bildirilen glutatyon peroksidazlar (GPX) indirgenmiş glutatyon (GSH) kullanarak H_2O_2 'yi suya ya da organik hidroperositlerin alkollere indirgenmesini katalize eden çoklu izoenzim ailesinin genel adıdır (88). GPX1, GPX enzim ailesinin hücrelerde en bol bulunan üyesidir. GPX1 lipid hidroperoksitleri ve diğer bazı hidroperoksitleri membran lipidlerinden salındıktan sonra azaltabilen, hücre içi hidrojen peroksitin zararlı birikimini önlemede rol oynayan önemli bir antioksidan enzimdir (89). Hidrojen peroksit gibi bazı reaktif oksijen türleri büyüme faktörü aracılı sinyal iletimi, mitokondriyal fonksiyon ve normal tiyol redoks dengesinin korunması için gereklidir. GPX1 ayrıca hidrojen peroksit birikimini sınırlayarak bu süreçlerin de düzenlenmesini sağlar (90).

Oksidatif stres nörodejeneratif hastalıklar, kronik böbrek hastalığı, hiperkolesterolemi, diyabet, karaciğer inflamasyonu, karaciğer sirozu gibi birçok farklı bozukluğun gelişmesinde ve ilerlemesinde rol alan ana faktör olarak görülmektedir (91, 92). Artan kanıtlar fazla miktarda makrobesin tüketiminin oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Fazla karbohidratlı bir diyetin aşırı tüketimi sonucu alınan yüksek kalori, daha fazla substratın mitokondriyal solunuma girmesine ve elektron taşıma zincirine verilen elektronların sayısının artmasına neden olur. Artan elektronlar, protonları mitokondriyal iç zar boyunca pompalayarak yüksek bir mitokondriyal zar potansiyeli oluştururlar. Bu durum elektron taşıma sistemi içerisindeki kompleks III'te elektron taşınmasını azaltır. Sonuç olarak yüksek düzeyde süperoksit üretimi gerçekleşir (93, 94). Sadece fazla karbohidratlı değil fazla yağlı besin tüketiminin de adipoz, böbrek ve karaciğer gibi çeşitli dokuların mitokondrilerinde H_2O_2 üretiminin artışına neden olduğu ve artan ROS birikimine bağlı olarak da oksidatif stres meydana geldiği gösterilmiştir (95). Oksidatif stresin yükselmesi kronik inflamasyonla bağlantılıdır. ROS Nükleer Faktör kappa B (NF- κ B) aracılığıyla pro-inflamatuvar monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1), tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve interleukin (IL)-6 gibi sitokinlerin üretimini aktive eden sinyal yollarını indükleyebilir (96).

2.6. İnflamasyon

İnflamasyon organizmanın fiziksel, kimyasal veya biyolojik kaynaklı çeşitli zararlı uyaranlara, atık ürünlere ve hastalıklı hücelere karşı oluşturduğu fizyolojik bir yanıttır. İnflamasyon homeostazisin devamlılığı için vücudun savunma mekanizmasında rol oynar (97). İnflamasyon esnasında; hücresel bozulma ortadan kaldırılır veya ilgili bölgede sınırlı tutulur. Aynı zamanda hücresel bozulma sırasında oluşan nekrotik hücreler ile dokular da ortamdan uzaklaştırılır (98).

İnflamasyon, sürecin süresine ve çeşitli immün faktörlere göre akut inflamasyon veya kronik inflamasyon olarak adlandırılır. Akut inflamasyon inflamatuvar etkenlere karşı verilen ilk yanıttır, aniden gelişir ve genellikle hızlı olarak seyreder. Akut inflamasyon hasarın boyutuna bağlı olarak dakikalar veya birkaç gün sürebilir. Nedeni ortadan kaldırıldığında, sınırlandırıldığında veya elemine edildiğinde inflamasyon uyarısı kesilir ve akut inflamasyon sona erer. Akut inflamasyonun başlıca özelliği plazma proteinlerinin veya lökositlerin ekstrasvasküler alana hızlı ve kısa sürede hareket etmesiyle inflamatuvar yanıtın oluşmasıdır (99). Bir enfeksiyon ya da doku hasarı sonucu akut inflamasyonun başlamasındaki ilk etki inflamatuvar ve bağışıklık hücrelerinin ilgili bölgeye göç etmesi, çoğalması ve aktivasyonu ile karakterizedir. İlgili bölgeye kemokinler yardımıyla gelen nötrofiller aracılığıyla akut inflamasyon süreci başlatılır (100). Nötrofiller kemokin salgılayan hücrelerce aktive edildikten sonra makrofajlar ilgili bölgeye göç ederler. Aktifleşen makrofajlar tarafından sitokinler salgılanır (101). Sitokinler, çoğu hücre tipinin büyümesinde, farklılaşmasında ve işlevinin kontrolünde rol oynayan polipeptid yapıda mediyatörlerdir ve bağışıklık hücreleri arasındaki sinyallere aracılık ederler. Sitokinler pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinler olmak üzere ikiye ayrılırlar (102). Akut inflamasyonda görev alan başlıca pro-inflamatuvar sitokinler; IL-1, IL-6, interferon-gama (IFN- γ) ve TNF- α 'dır (103, 104). TNF- α proliferasyon, inflamatuvar mediatörlerin üretimi ve hücre ölümü gibi hücresel yanıtları indükleyen pro-inflamatuvar bir sitokindir (105). TNF- α üretiminden sonra vasküler endotel hücreleri tarafından farklı lökositlerin bağlanmasını gerektiren çeşitli adezyon molekülleri açığa çıkar ve böylece pro-inflamatuvar bir davranış oluşur (106). İnaktif formda olan pro-IL-1 β , IL-1 tarafından aktive edilir ve aktif formu olan IL-1 β 'ya dönüştürülür (107). Güçlü pro-inflamatuvar etkinliği olan IL-1 β ilk tanımlanan sitokinler arasında yer alır. IL-1 β inflamasyon bölgesinde lokal olarak kan akışının artmasında, lökosit alımında ve nötrofillerin infiltrasyonunda rol oynar (108, 109). Kronik inflamasyon doku nekrozu ve fibrozis ile karakterize, lenfosit ve makrofajların

birikimi ile histolojik olarak da gözlemlenebilen bir süreçtir. Kronik inflamasyon akut inflamasyon sonrasında ya da inflamatuvar cevabın başlangıçtan itibaren de gelişebilir, haftalarca, aylarca ve hatta yıllarca devam edebilir. Kronik inflamasyon esnasında başlıca makrofajlar, lenfositler, plazma hücreleri, eozinofiller, fibroblastlar ve vasküler endotelial hücreler rol oynamaktadır (110). Doku hasarı, metabolik stres ve aşırı besin tüketimi gibi etkenler birçok faktörü de etkileyerek inflamatuvar yanıtın başlamasına veya kronik olarak seyretmesine neden olurlar. İnflamasyon etmeni veya onu tetikleyen faktörler ortadan kaldırıldığında çeşitli kontrol mekanizmaları devreye girer. İnflamasyonun oluşmasında rol alan hücreler daha fazla indüklenmez ve sayıca azalırlar. Bununla ilişkili olarak pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β , IL-6) salınımı inhibe edilirken anti-inflamatuvar sitokinlerin (IL-4 ve IL-10) salınımı artırılır (111, 112).

Anti-inflamatuvar etkinliğe sahip IL-4 pleotropik bir glikoproteindir. IL-4 doku adezyon moleküllerinin ekspresyonunda değişikliklere neden olarak T-hücreleri ve eozinofillerin inflamasyon bölgesine aracılık etmesini sağlar (113). Ayrıca makrofajların işlevlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (114). IL-10 ise daha çok monositler, B hücreleri ve T hücreleri tarafından üretilen homodimerik bir sitokindir. IL-10'un ana hedefi monositlerin/makrofajların inhibisyonunun sağlanmasıdır. IL-10 monositlerden ve makrofajlardan pro-inflamatuvar mediatörlerin salınımını inhibe ederek, lipopolisakkarit (LPS) ve IFN- γ kaynaklı TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) gibi sitokinlerin salınımını da inhibe eder. IL-10, tıpkı monositlerde olduğu gibi nötrofilik granülositlerde de proinflamatuvar mediatörlerin salınımını inhibe eder. Böylece TNF- α ve IL-1 β üretimi de engellenir (115).

İnflamatuvar yanıtın kontrol altına alınamadığı aşırı inflamasyon durumunda hücre ve dokularda hasar oluşur. Karaciğeri de içeren çeşitli organlarda oluşan bu hasara bağlı olarak kronik hastalıklar gelişebilir (116). Karaciğerde üretilen sayısız bağışıklık hücreleri genel doku sağlığının korunmasında önemli bir role sahiptir (117). Diyetle birlikte alınan aşırı miktarda karbohidrat, beslenme kaynaklı oluşan inflamasyonun uzun vadedeki olumsuz sonuçlarına katkıda bulunur. Fazla glukoz, pro-inflamatuvar sitokin salınımını teşvik eder, temel doğal immün hücre aktivatörü olan yüzey proteini toll benzeri reseptör (TLR)-4'ün ekspresyonunu artırır, pro-inflamatuvar sinyal yollarını güçlendirir ve monositlerde/makrofajlarda karakteristik pro-inflamatuvar mikropartiküllerin salınımına neden olur (118). Fazla yağlı beslenmenin ise NF- κ B yolunun aktivasyonunu sağlayarak

pro-inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunun indüklenmesinde dolaylı yoldan katkı sağladığı bildirilmektedir (119).

2.7. Bergamottin

Obezite, metabolik sendrom, diyabet, kanser ve karaciğer hastalıkları gibi metabolik hastalıklar önlenabilir ve tedavi edilebilir patolojilerdir. Bu hastalıkların tedavisi için çeşitli ilaçlar geliştirilmiş olunmasına rağmen hala dünya çapında ölümlere yol açmaya devam etmektedirler (120). Bu nedenle bu hastalıkların gelişimine neden olan faktörlerin belirlenmesi ve klinik tablonun seyrinin önüne geçilmesine yönelik tedbirlerin alınması büyük önem taşımaktadır. Bilim insanlarının metabolik hastalıklarda oluşan hasarı azaltabilecek ajanlara olan ihtiyaçları ve bu konudaki çalışmalara duyulan ilgi güncelliğini korumaktadır.

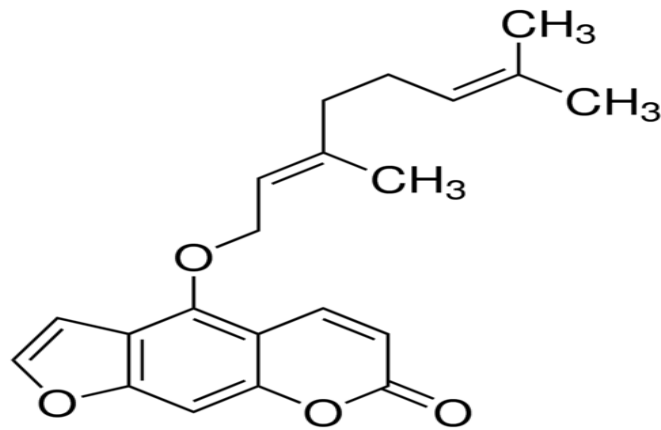
Bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalıkların zararlı etkilerini ve bu hastalıkların tedavisinde oluşabilecek yan etkileri en aza indirecek ilaç adayları bulmak oldukça zordur (120). Doğal ürünler, insanlık tarihi boyunca çeşitli hastalıkların önlenmesinde ve tedavi edilmesinde kullanılmış, günümüz modern ilaçlarının geliştirilmesine de katkıda bulunmuşlardır (121). Sentetik bileşiklerle mukayese edildiklerinde ise yapısal çeşitlilik gösterdikleri ve çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip oldukları da görülmüştür (122). Bitkiler ve bitkisel ürünlerin, hem yiyecek ve içecek şeklinde tüketimi hem de tıbbi tedavi amacıyla kullanımı dünya çapında giderek artmaktadır. Meyve, baharat veya bitkilerde bulunan bazı bileşenlerin (örneğin, greyfurt suyunda bergamottin ve zerdeçalda kurkumin gibi) bir kez kullanımında bile sağlığa yararlı etkileri olduğu görülmektedir (123). Farklı sağlık amaçları için kullanılan şifalı bitkiler, birçok hastalığın tedavisinde etkin rol oynamaları nedeniyle bilim camiasında da büyük yankı uyandırmıştır (124). Son yıllarda doğal ürünlerin anti-inflamatuvar, antioksidan, antidiyabetik, anti-obezite, hipolipidemik ve hepatoprotektif gibi birçok özelliği nedeniyle çeşitli karaciğer hastalıklarının tedavisinde alternatif bir yöntem olarak tercih edildikleri görülmektedir (125).

Rutaceae familyasına ait olan Citrus cinsi turunçgillerin, Güneydoğu Asya'nın belirli bölgelerinden geldiğine inanılmaktadır. Bununla birlikte çoğunlukla Kuzey Yarımküre'deki bölgelerde yetiştirilmektedirler. Başlıca turunçgiller arasında portakal, mandalina, limon, greyfurt ve misket limonu gelmektedir. Turunçgiller sadece bir C vitamini kaynağı değil, aynı zamanda diyet lifi, şeker ve mineraller gibi besinler açısından da oldukça zengindirler. Turunçgiller arasında greyfurt ve greyfurt suyunun dünya genelinde tüketilen en popüler meyve sularından birisi olduğu görülmekte ve bu nedenle sağlık üzerindeki olası etkileri araştırılmaktadır (13, 126). Greyfurt meyvesinde flavonoidler, karotenoidler, organik asitler, kumarinler ve fitokumarinler gibi çeşitli biyoaktif fitokimyasallar mevcuttur. Bu fitokimyasallar arasında furanokumarinlerin ise anti-inflamatuvar, anti-kanser ve anti-obezite gibi çeşitli etkilere sahip oldukları gösterilmiştir (14, 127). Başlıca greyfurt furanokumarinleri arasında ise bergaptol, bergapten, epoksibergamottin, 6',7'-dihidroksibergamottin ve bergamottin gelmektedir (128).

Bergamottin (BGM) ilk olarak 1937 yılında bergamot (citrus bergamia) yağında tespit edilen doğal bir furanokumarin bileşiğidir. Bergamotun uçucu yağında bulunmasının yanı sıra, limon yağı, greyfurt suyu, citrus aurantifolia'nın kabuğu gibi citrus ailesinin meyvelerinde de varlığı tespit edilmiştir. Bergamottin'in bitkisel kaynaklardaki dağılımı bitkinin türü, çeşidi, dokusu, yeri ve olgunluk evresi vb. durumlara göre değişkenlik göstermektedir (128, 129). BGM'nin molekül formülü $C_{21}H_{22}O_4$ ve molekül ağırlığı 338.4 g/mol'dür.

Furanokumarinler hem insanlarda hem de hayvanlarda ağızdan alındıktan sonra gastrointestinal kanalda hızla emilirler. Esas olarak karaciğerde CYP450'ye bağlı monooksijenaz yoluyla metabolize edilirler ve epoksidasyon, hidroksilasyon, glukuronid konjugasyonu ve lakton halkasının hidrolitik açılması ile dönüştürülürler (130). Bergamottin sistemik kullanılabilirliğe sahiptir. Vücuda alındıktan sonra insanlarda bergaptol metabolize edilir (131, 132). CYP450, sitokrom P450 ailesi 3 alt ailesi A üyesi 5 (CYP3A5) ve sitokrom P450 ailesi 2 alt aile B üyesi 6 (CYP2B6), aktif glutatyon konjugatları oluşturabilen bergamottin metabolitlerinin oluşumunu indükler. Bergamottin'in furan halkasının sitokromlar tarafından metabolize edilmesi, reaktif ara ürünlerin oluşumuna neden olduğu ve böylece P450 enziminin inhibisyonuna neden olabileceği, geraniloksi zincirinin metabolizmasının ise stabil metabolitler üretebileceği gösterilmiştir. CYP2B6'nın bergamottini öncelikle 5'-OH-bergamottin, 6'-OH-bergamottin ve 7'-OH-bergamottine ve

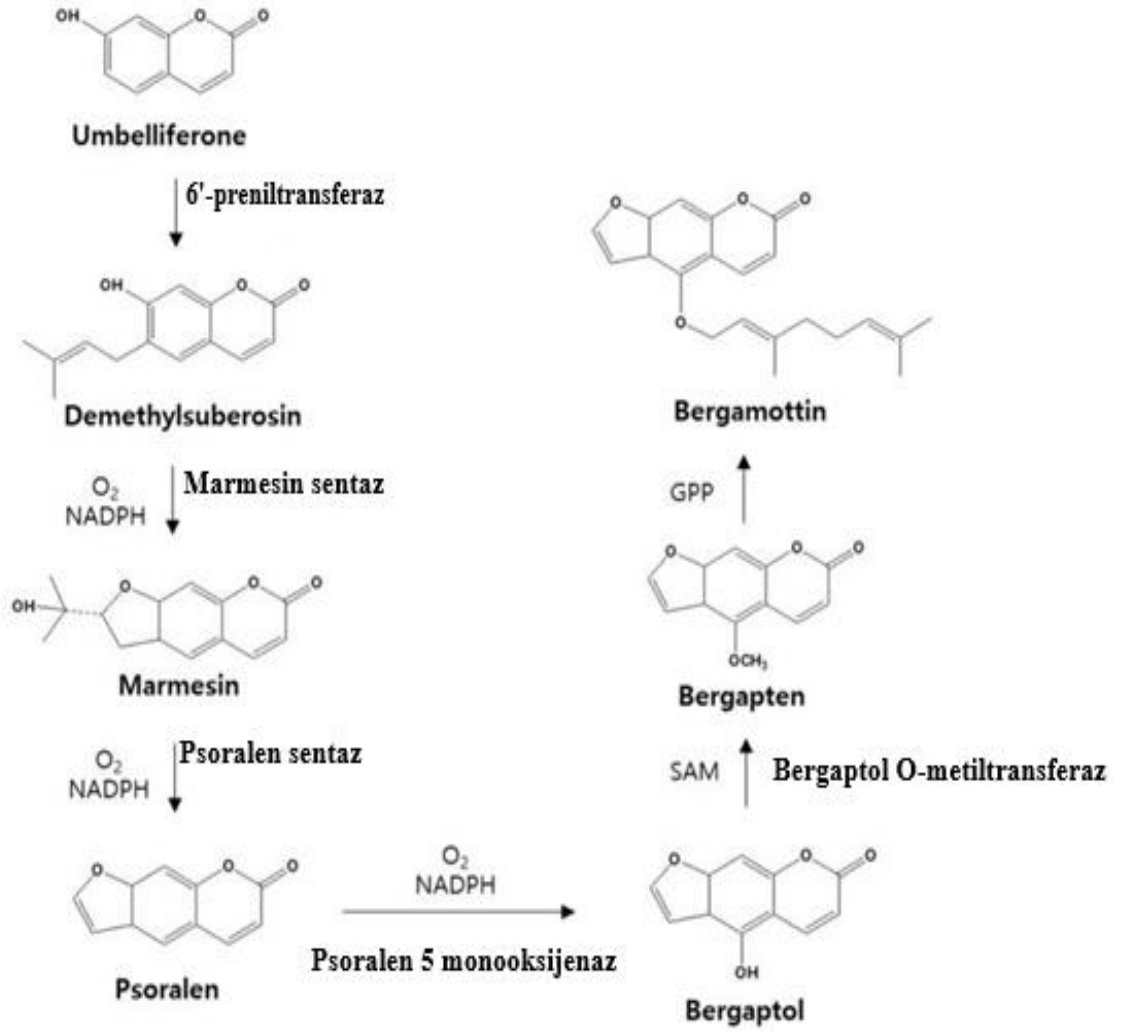
ayrıca bir minör metabolite (bergapten) metabolize ettiği bulunmuştur. BGM CYP3A5 ile metabolize edildiğinde bergaptol, 5'-OH-bergamottin ve 2'-OH bergamottin olarak üç ana metabolite ve ayrıca iki küçük metabolit olan 6',7'-dihidroksibergamottin ve 6'- ve 7'-OH-bergamottin'e dönüşebilir. İnsanlar üzerinde yapılan farmakokinetik bir çalışmada, 6 ve 12 mg bergamottin (500 µL etanol içeren jelatin kapsül ile) uygulamasından sonraki bergamottin'in maksimum konsantrasyon değerlerinin sırasıyla 2.1 ve 5.9 ng/mL ve maksimum konsantrasyona ulaşma süreleri (Tmax) sırasıyla 0.8 ve 1.1 saat olduğu görülmüştür. Uygulanan 6 mg veya 12 mg bergamottin dozunun, sırasıyla yaklaşık 3.5 veya 7 bardak (250 mL) greyfurt suyu tüketimiyle eşdeğer olduğu bildirilmiştir (133). Sağlıklı genç yetişkinlerde greyfurt veya greyfurt suyu alımından önce ve sonra furanokumarinlerin konsantrasyonlarını belirlemek için yapılan bir çalışmada ise, bergamottin ve 6',7'-dihidroksibergamottin greyfurt meyvesi, meyve suyu ve plazmada bulunan baskın bileşikler iken, bergaptol ve 6',7'-dihidroksibergamottinin idrarda tespit edilen başlıca bileşikler olduğu görülmüştür (131-133). Bergamottin zayıf bir polariteye sahip olmakla birlikte yapısı gereği dört hidrojen bağı yapabilir ve bu bağları oluştururken hidrojen alıcı olarak davranır (134, 135). Şekil 1. de BGM'nin kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 1. BGM'nin kimyasal yapısı (Ko'dan, 132)

Bergamottin biyosentezi, umbelliferonun alkilasyonu ile oluşan demetilsuberosin oluşumu ile başlamaktadır. Umbelliferon, genellikle hem yapısal hem de biyogenetik olarak daha karmaşık furanokumarinlerin atası olarak kabul edilmektedir. Demetilsuberosin, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve oksijen varlığında ayrıca CYP monooksijenaz katalizörlüğünde marmesine dönüştürülür. Bu işlem daha sonra

hidroksiizopropili marmesinden çıkarmak için psoralene dönüştürmek ve sonrasında bergaptol oluşturmak için 5 pozisyonunda bir hidroksil grubu eklemek için tekrarlanır. Bergaptol daha sonra bergapten oluşturmak için S-adenosil metiyonin ile metillenir. Bergamottin biyosentezindeki son adım ise yeni metillenmiş bergaptene bir geranil pirofosfatın bağlanmasıdır (132, 136) Şekil 2.de BGM biyosentezi şematize edilmiştir.



Şekil 2. Bergamottin biyosentezi (Ko'dan, 132).

Hoş aromaları ve sağlığa yararlı olmaları nedeniyle narenciye esanslı yağlar ilaç, gıda ve koku endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (14). BGM'nin anti-kanser (anti-proliferasyon, anti-invazyon ve anti-migrasyon, vb.), anti-inflamatuvar, anti-mikobakteriyel aktivite, anti-mutajenite gibi çeşitli farmasötik biyoaktivite özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir (128). BGM, tirozin fosfatazı indükleyerek hem yapısal hem de indüklenabilir sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3)' nün aktivasyonunu inhibe eder. Bu da BGM'nin tümör hücresinin hayatta kalması, proliferasyonu ve metastazının etkili bir şekilde baskılanmasında önemli bir aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (137). BGM sitokrom P450 enziminin bazı izoformlarının, özellikle de CYP3A4'ün protein ekspresyonunu azaltarak veya enzimin geri dönüşümlü inhibisyonunu sağlayarak etki gösterir. Ayrıca insan karaciğer mikrozomlarındaki CYP1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 ve 3A4'ün aktivitelerini de baskılayabildiği gösterilmiştir (136). BGM'nin peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör (PPAR) α 'yı veya γ 'yı aktive ettiği, adiponektin salgılanmasını indüklediği ve adipositlerde VLDL'yi inhibe ettiği de bildirilmiştir. Bergamottin'in, CCAAT/enhancer-binding protein (CEBP/ α), PPAR, adiposit proteini 2, adiponektin ve resistin gibi temel adipogenik genlerin, down regülasyonu yoluyla adipogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir. Ko ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada yüksek yağlı diyet kullanılarak obezitenin indüklendiği farelerde, BGM'nin anti-obezite etkisine sahip olduğu ve adiposit farklılaşması sırasında doğrudan 5'-adenozin monofosfat aracılıklı aktive protein kinaz (AMPK)'ın adipogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (138). Yapılan başka bir çalışmada Bergamottin'in, NF- κ B sinyal aktivasyonunu bloke etme yeteneğine sahip olduğu ve bu sayede antiinflamatuvar etki gösterebileceği bildirilmiştir (139). BGM'nin, glukoz metabolizmasında da potansiyel bir düzenleyici aktivitesi olduğu yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (128).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Laboratuvarında Kullandığımız Cihaz ve Malzemeler

Laboratuvarında kullandığımız cihaz ve malzemelere ait bilgiler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Laboratuvarında kullandığımız cihaz ve malzemelere ait bilgiler

Cihaz ve Malzeme Adı	Firma Adı
Havalandırılmalı kafes sistemi	RAIR IsoSystem
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo Electron Corporation
Otomatik pipetler	Socorex, Isolab, Eppendorf
Hassas terazi	Mettler Toledo AB204-S
Vorteks	IKA Vortex, Genius 3
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Termal
Saf su arıtma cihazı	ELGA
Santrifüj	Eppendorf, Centrifuge 5810
Çalkalayıcılı inkübatör	ShellLab/Sheldon S14-2
Soğutmalı santrifüj	Beckman-Coulter
Mikrosantrifüj cihazı	Thermo
Mikroplate okuyucu	VersaMax
El homojenizatörü	OMNI-Tissue Master 125
Sonikatör	Vibra Cell-VCX 500
GeneAmp PCR Sistem 9700	Thermo
Mikro hacimli spektrofotometre	Thermo Nanodrop 2000
LightCycler 480-II	Roche
Sarı kapaklı biyokimya tüpü	BD Vacutainer
Cam deney tüpleri	SH&GLASS
DNAse/RNAse free mikrosantrifüj tüpleri	KIRGEN
LightCycler 480 multiwell plate	Roche
LightCycler 480 kaplama folyosu	Roche

3.1.2. Kullandığımız Kitlere Ait Bilgiler

Kullandığımız kitlere ait bilgiler Tablo 2’de verildi.

Tablo 2. Kullandığımız kitlere ait isim, marka ve kod bilgileri

Kitin İsmi	Markası	Kitin Kodu
Fare GPx1 ELISA kiti	Fine test	EM0367
Fare SOD1 ELISA kiti	Fine test	EM0419
Fare TNF- α ELISA Kiti	Fine test	EM0183
Fare IL-10 ELISA Kiti	Fine test	EM0100
Fare IL-4 ELISA Kiti	Fine test	EM0119
Fare IL-1 β ELISA Kiti	Fine test	EM0109
Fare CHOP ELISA Kiti	Fine test	EM1933
Fare HSPA5 ELISA Kiti	Fine test	EM1566
Fare İnsülin ELISA Kiti	Crystal Chem	#90080
TAS Analiz Kiti	Rel Assay Diagnostics	OK20115A
TOS Analiz Kiti	Rel Assay Diagnostics	OK201270
BCA Protein Analiz Kiti	ABP Biosciences	AB20011P1
Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit	Roche	14854822
SYBR Green I Master Kit	HibriGen	1119-UB-698

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Bu çalışmada kullanılmış olan kimyasal malzemeler ile marka isimleri Tablo 3'te belirtilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullandığımız kimyasallara ait bilgiler

Kimyasallar	Marka
1,1,3,3-Tetrametoksipropan	Sigma
Asetik Asit (CH_3COOH)	Sigma
Bergamottin	Sigma- Cat. No. BCBZ6708
Dietil Pirekarbonat (DEPC)	Sigma
Dimetil Sülfoksit	Sigma
DPBS (Hazır Fosfat Tamponu)	Pan Biotech-Cat. No. P04-36500
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Riedel de Haen
Fosfotungstik Asit ($\text{H}_3[\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4]\cdot x\text{H}_2\text{O}$)	Sigma
Fosforik Asit (H_3PO_4)	Sigma
Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Merck
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma
İzopropil Alkol	Merck
Kloroform	Merck
$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot\text{H}_2\text{O}$	Sigma
Primerler	Integrated DNA Technologies- Cat. No.70420211
Sülfirik Asit (H_2SO_4)	Sigma
Tiyobarbitürik Asit	Sigma
TriPure İzolasyon Reaktifi	Roche- LOT 94022220

3.2. Yöntemler

3.2.1. Uygulanan Diyet Müdahalesi

Laboratuvar tipi kemirgen yemi ve kafeterya diyetinde bulunan malzemeler %30 laboratuvar tipi kemirgen yemi ve %70 kafeterya diyeti olacak şekilde karıştırılarak pellet haline getirildi ve farelere ad libitum olarak verildi (140). Alınan enerjinin hesaplanmasında kullanılan gıda maddelerinin ambalajlarında belirtilen değerler esas alındı. Kafeterya diyetini oluşturan laboratuvar tipi kemirgen yemi ile fındıklı bisküvi, çoko damlalı bisküvi, gofret, cips, tuzlu kraker, meyveli kek ve kaşar peyniri hesaplanan miktarlarda satın alınıp laboratuvar tipi öğütücülerle toz haline getirildi. Toz haline getirildikten sonra MBD YEM TİCARET (Gebze/Kocaeli) adlı firmada %30 laboratuvar tipi kemirgen yemi ve %70 kafeterya diyetini içerecek şekilde toz malzemeler karıştırılarak pellet haline getirildi. Hazırlanan yemler buzdolabına kaldırıldı ve taze olarak farelerin tüketimine sunuldu. Kafeterya diyeti oluşturulurken kullanılan besin çeşitleri, markası ve makro besin öge içerikleri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Besinlerin 100 g için enerji, karbohidrat, protein ve yağ içerikleri

Besin (Markası)	Enerji (kcal)	Karbohidrat (g %)	Protein (g%)	Yağ (g%)
Fındıklı Bisküvi (Süsse)	470	64.2	7.8	19.5
Çokodamlalı Bisküvi (Süsse)	460	60.3	9.9	18.8
Peynirli Cips (Party)	481.12	69.06	6.7	20.64
Tuzlu Kraker (Bifa)	405	76	6.4	7.34
Meyveli Kek (Casey)	378	56	4.2	1.4
Çikolatalı Gofret (Centro)	517	63.1	5.8	26.9
Kaşar Peyniri (Aknaz)	312	0.4	21	25

3.2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Tasarım

KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na deney hayvanı temini için başvuru yapıldı. 2020/28 protokol numaralı (Bkz. Ek1) onay belgesinin alınmasının ardından 48 adet erkek, 10-15 gram ağırlığında, dört-beş haftalık C57BL6/J ırkı fareler KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden satın alınarak kullanıldı. Kullandığımız farelerin gün içerisinde 12 saat karanlıkta ve 12 saat de aydınlıkta kalmaları sağlandı. Satın alınan fareler bireysel olarak ayrı bir şekilde havalandırılan kafeslerde (RAIR IsoSystem, Delaware, USA) barındırıldı. Farelerin diyetleri ve suları ad libitum olarak verildi. Oluşturulan gruplara 16 hafta boyunca laboratuvar tipi kemirgen yem ve kafeterya diyeti verildi. Fareler rastgele bir şekilde altışarlı gruplara ayrıldı. Her grupta sekiz fare yer aldı. Bergamottin, %5'lik dimetilsülfoksit (DMSO) ve pH=7.4 hazırlanan potasyum fosfat tamponu (PBS) ile çözöldü (141,15) ve dozları önceki çalışmalara dayalı olarak seçildi (142, 143). Grup I'deki (K grubu) fareler deney süresince laboratuvar tipi kemirgen yem ile beslendiler. Grup II'deki (K+Çözöcü grubu) fareler deney süresince laboratuvar tipi kemirgen yem ile beslendiler ve farelere deneyin son dört haftası DMSO+PBS çözöltisinden her gün 100 µL intraperitoneal (ip) olarak uygulandı. Grup III'teki (K+0.22BGM grubu) fareler deney süresince laboratuvar tipi kemirgen yem ile beslendiler ve farelere deneyin son dört haftası BGM (0.22 mg/kg) her gün 100 µL ip olarak uygulandı. Grup IV'teki (KD+Çözöcü grubu) fareler deney süresince kafeterya diyeti ile beslendiler ve farelere deneyin son dört haftası DMSO+PBS çözöltisinden her gün 100 µL ip olarak uygulandı. Grup V'teki (KD+0.05BGM grubu) fareler deney süresince kafeterya diyeti ile beslendiler ve farelere deneyin son dört haftası BGM (0.05 mg/kg) her gün 100 µL ip olarak uygulandı. Grup VI'daki (KD+0.22BGM grubu) fareler deney süresince kafeterya diyeti ile beslendiler ve farelere deneyin son dört haftası BGM (0.22 mg/kg) her gün 100 µL ip olarak uygulandı.

Tüm enjeksiyonlar ip olarak uygulandı. Tüm gruplar 16 hafta boyunca beslenme programına tabi tutuldu ve 16 haftalık beslenme periyodu boyunca sakrifiye edilene kadar belirli zaman aralıklarında tartıldı. Fareler 16. haftanın sonunda on iki saatlik açlığa maruz bırakıldı ve sakrifiye edildi. Kesim esnasında kanlar antikoagölansız biyokimya tüplerine alındı. 3000 rpm'de on dakika santrifüj edildi. Serum kısmı 1.5 mL hacimli ependorf tüplere aktarıldı ve analiz yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Karaciğer dokuları eksize edildi ve tartıldıktan sonra bir lobun yarısı histopatolojik analizde kullanım için %10'luk

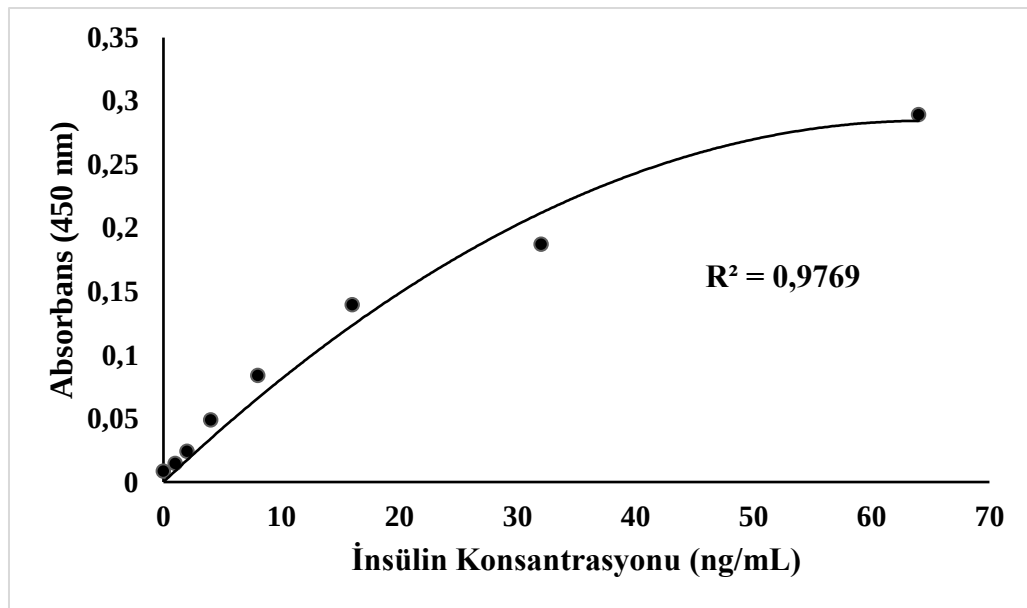
formaldehitte sabitlendi diğer yarısı ise biyokimyasal analiz için analiz gününe kadar ependorf tüpler içinde -80°C'de saklandı.

3.2.3. Serum Örneklerinde Glukoz, Triaçilgliserol, Total Kolesterol, ALT ve AST Seviyelerinin Analizi

Açlık serum glukoz, TAG, total kolesterol (T-K), aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri rutin biyokimya laboratuvarında otoanalizör ile belirlendi. Serum glukoz, TAG ve T-K konsantrasyonları mg/dL cinsinden, AST ve ALT konsantrasyonları ise U/L cinsinden ifade edildi.

3.2.4. Serum Örneklerinde İnsülin Seviyelerinin Belirlenmesi

Serum örneklerindeki açlık insülin seviyeleri, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) metoduyla araştırma amaçlı üretilen kitle verilen yöntem protokolüne uygun şekilde belirlendi (Crystal Chem, Katalog numarası: #90080, USA). İnsülin konsantrasyonlarının hesaplanmasında Şekil 3'te verilen standart grafiği yardımıyla elde edilen formül kullanıldı. Sonuçlar ng/mL şeklinde verildi. Farelerde insülin direnci derecesinin yansıtılması açısından, açlık serum glukozu ve insülin konsantrasyonu parametrelerinin kullanılmasıyla homeostatik model değerlendirme (HOMA) skoru insülin $\mu\text{IU} / \text{ml} \times \text{glukoz} (\text{mmol/l}) / 22.5$ formülü ile hesaplandı (144).



Şekil 3. İnsülin seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

3.2.5. Serum Örneklerinde Toplam Oksidan Durum Analizi

Serum örneklerinde TOS düzeyleri ölçümü için ticari kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, REF RL0024, Gaziantep, Turkey) kullanıldı. TOS ölçümleri Tablo 5’de verilen deney prosedürü basamakları takip edilerek yapıldı. TOS düzeyleri μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/L olarak sunuldu.

Tablo 5. Serum TOS ölçüm basamakları

Reaktif	Numune (μL)	Standart (μL)
Standart	-	15
Numune	15	-
*Reaktif 1	100	100
Pleyt kuyucularına standart veya numune ekledikten yaklaşık 30 saniye sonra ELISA okuyucusunda 530 nm dalga boyunda birinci okuma (A_1) yapıldı.		
**Reaktif 2	5	5
Reaktif 2 eklendikten sonra laboratuvar ortamında 10 dakika bekletildi ve ELISA okuyucusunda 530 nm dalga boyunda ikinci okuma (A_2) yapıldı.		

* Tampon Çözeltisi, 25 mM, pH’sı 1.75 H_2SO_4 , ** Substrat Çözeltisi, 25 mM, pH’sı 1.75 H_2SO_4 , 5 mM Fe^{2+} iyonu, 10 mM O-dianizidin

Hesaplama yapılırken her numune ve standart için kaydedilen ikinci absorbens değerinden (A_2) birinci absorbens değeri (A_1) çıkartılarak absorbens farkları elde edildi ($\Delta A = A_2 - A_1$). Sonuçlar “($\Delta A_{\text{Numune}} / \Delta A_{\text{Standart}}$) x standart konsantrasyonu” formülü ile hesaplanarak μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/L şeklinde verildi.

3.2.6. Serum Örneklerinde Toplam Antioksidan Durum Analizi

Serum örneklerinde TAS seviyeleri ölçümünde ticari kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, REF RL0017, Gaziantep, Turkey) kullanıldı. TAS ölçümleri Tablo 6’da verilen deney prosedürü basamakları takip edilerek yapıldı. TAS seviyeleri milimol troloks eşdeğeri/L cinsinden ifade edildi.

Tablo 6. Serum TAS ölçüm basamakları

Reaktif	Numune (µL)	Standart (µL)	H ₂ O (µL)
Deiyonize edilmiş su	-	-	6
Standart	-	6	-
Numune	6	-	-
*Reaktif 1	100	100	100
Reaktif 1 eklendikten 30 saniye sonra ELISA okuyucusunda 660 nm dalga boyunda ilk absorbens değeri (A ₁) okundu.			
**Reaktif 2	15	15	15
Reaktif 2 eklendikten sonra pleyt laboratuvar ortamında 10 dakika bekletildi. ELISA okuyucusunda 660 nm dalga boyunda ikinci absorbens (A ₂) değeri okundu.			

* Tampon Çözeltisi, 0.4 mol/L pH’sı 5.8 Asetat Tamponu, ** Prokromojen Çözeltisi, 0.4 mol/L pH’sı 3.6 Asetat Tamponu, 30 mmol/L ABTS

Hesaplama yapılırken her numune ve standart için kaydedilen ikinci absorbens değerinden (A₂) birinci absorbens değeri (A₁) çıkartılarak absorbens farkları elde edildi ($\Delta A = A_2 - A_1$). Pozitif kontrol için pleyt kuyucuklarına saf su (H₂O) pipetlendi. Sonuçlar “ $[(\Delta A_{H_2O}) - (\Delta A_{Numune})] / [(\Delta A_{H_2O}) - (\Delta A_{Standart})] \times \text{standart konsantrasyon}$ ” formülüne göre hesaplandı ve milimol troloks eşdeğeri/L cinsinden ifade edildi.

3.2.7. Serum Örneklerinde Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Hesaplanması

OSI değerleri aşağıda verilen formül kullanılarak belirlendi (145).

OSI (keyfi birim) = [TOS (mikromol hidrojen peroksit eşdeğeri/L)/(TAS (mmoL trolox eşdeğeri/L))] x 100

3.2.8. Serum Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi

Serum numunelerinde MDA seviyesi, Yagi (146) tarafından geliştirilmiş olan yöntem referans alınarak belirlendi. Örnekler için MDA konsantrasyonları Şekil 4’te verilen standart grafiği baz alınarak belirlendi. Sonuçlar nanomol/mililitre olarak ifade edildi. Öncelikle aşağıda verilen çözeltiler hazırlandı:

0.0084 N Sülfirik asit (H₂SO₄): Koyu renkli şişede bulunan H₂SO₄’den otomatik pipet ile birlikte 342 µL alındı. Daha önce cam beher içerisine konulan bir miktar saf su üzerine, alınan 342 µL H₂SO₄ aktarıldı. Son hacmin 150 mililitre olması için kalan kısım saf su eklenerek tamamlandı.

Fosfotungstik asit [H₃[P(W₃O₁₀)₄]H₂O] (%10’ luk): Şişede muhafaza edilen fosfotungstik asitten tartılarak ikibuçuk gram alındı ve 25 mililitre saf su ile cam beher içerisinde çözüldü.

Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi (%0.67’ lik): Şişede muhafaza edilen TBA hassas terazi üzerinde tartıldı ve 0.335 gram alındı. Tartılan 0.335’lik TBA 25 mililitre saf su ile cam balon joje içerisine koyuldu. Laboratuvarımızda mevcut olan ve ısıtıcı fonksiyonu da bulunan karıştırıcıda, içerisine manyetik bar atılarak 10 dakika boyunca çözüldürüldü. Karıştırıcının üzerinden alınan çözelti soğuduktan sonra üzerine 25 mL glasiyel asetik asit pipet yardımıyla dikkatlice eklendi.

Standart çözeltiler: 1 mmol 1,1,3,3-tetrametoksipropan, 100 mililitre 0.01 M hidroklorik asit (HCl) içerisinde ve 50 °C’ de yaklaşık 1 saat inkübasyon işlemine tabi tutuldu. Böylece 10 µmol/mL’lik ana stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltisinden de sırayla 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.7813, 0.3906 ve 0 nmol/mL’lik standart çözeltiler ependorf tüpler içerisinde hazırlandı.

Tablo 7. Serum MDA ölçüm basamakları

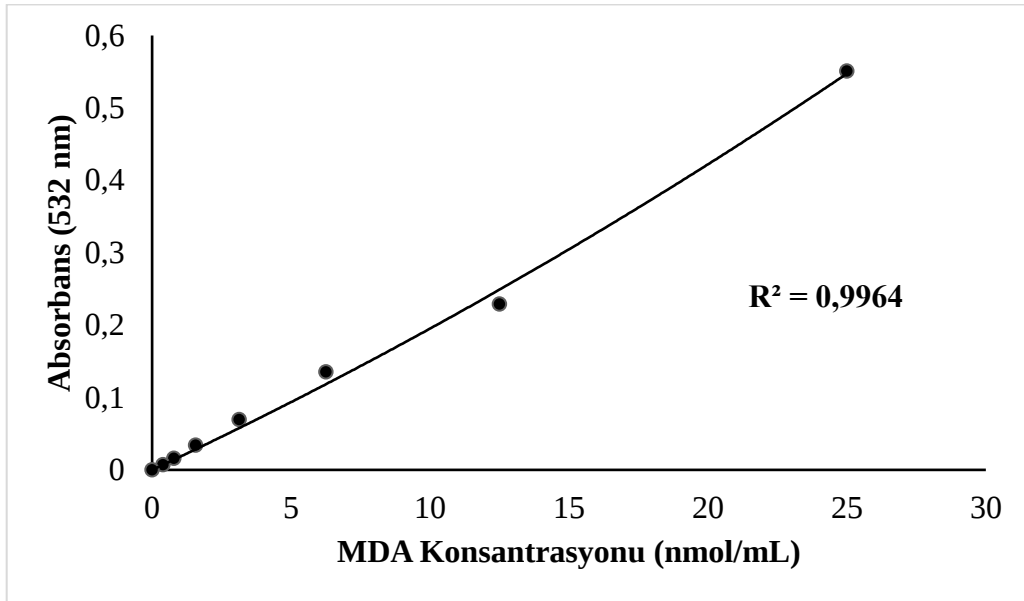
Reaktif	Miktar (µL)
Serum	150
H ₂ SO ₄	1200
Fosfotungstik Asit	150
Saf su	2000
TBA	500

İyice karıştırılarak oda sıcaklığında beş dakika bekletildi. Daha sonra 4000 rpm’de on dakika süreyle santrifügasyon yapıldı. Üst faz kullanılmadı dikkatlice atıldı.

Eklenen saf su ile çözününceye kadar vorteks işlemi uygulandı.

İnkübatör 100 °C’ye ayarladı ve tüpler metal raklar içerisinde üzerleri folyo ile örtülerek 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda tüplere 4000 rpm’de 10 dakika santrifügasyon yapıldı.

Üst faz bir pleyte aktarıldı ve 532 nm’de absorbans değerleri ölçüldü.



Şekil 4. Serum MDA seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

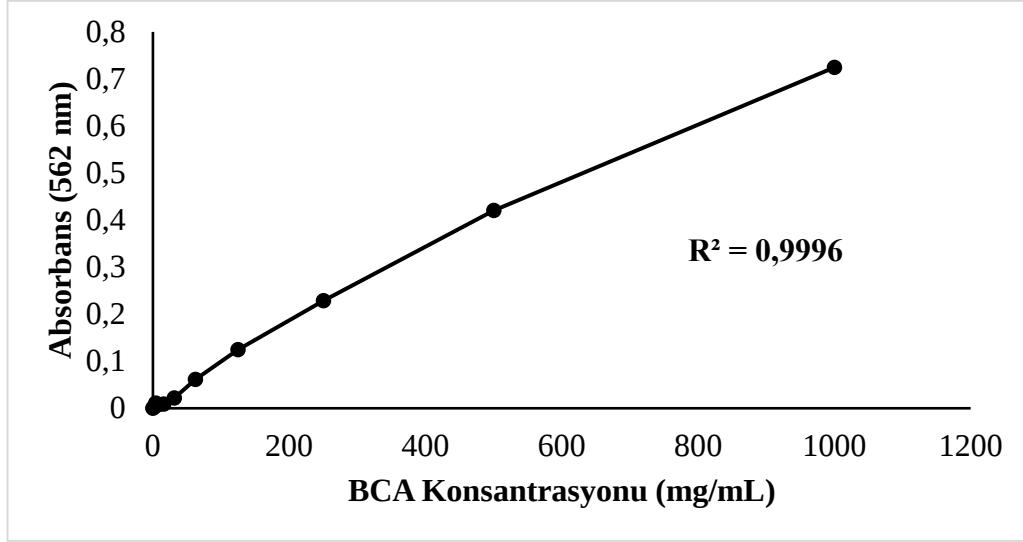
3.2.9. Karaciğer Dokularında Homojenizasyon Aşaması

Homojenizasyon işlemi için karaciğer numunelerinden yaklaşık 100 mg tartıldı. Ependorf tüp içerisine 900 mikrolitre pH'sı 7.4 olan PBS eklendi ve tartılan doku tüp içersine koyuldu. Sonics Vibra Cell Marka sonikatör ile 15 sn 130 Watt 20 khz'de homojenize edildi. Daha sonra 5000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Sonrasında numunelerin süpernatantları yeni ependorf tüplere aktarıldı. Dokuda ölçülecek parametreler için bu homojenizasyon kullanıldı.

3.2.10. Doku Örneklerinde Protein Miktar Tayini

Süpernatantların protein seviyeleri üretici firmanın talimatlarına göre ticari bir kit (BCA Protein Assay Kit, ABP Biosciences, Rockville, USA) kullanılarak belirlendi ve mg/mL sığır serum albümini eşdeğeri olarak hesaplandı. BCA (bisinkoninik asit) protein test kiti, alkali koşullar altında bir Cu^{2+} -protein kompleksi oluşumuna ve ardından sistein, sistin, triptofan, tirozin ve peptit bağları ile Cu^{2+} 'nin Cu^{1+} 'e indirgenmesine dayanır. BCA, Cu^{1+} ile mor renkli bir kompleks oluşturur ve 562 dalga boyunda saptanabilir. Süpernatantlarda ölçülen tüm biyokimyasal parametreler, protein miktarıyla oranlandı ve mg protein olarak ifade edildi.

Kit protokolünde; 50 kısım BCA Reaktif A'yı 1 kısım BCA Reaktif B ile (50:1, A:B) karıştırılarak çalışma reaktifleri hazırlanması önerildiği için numune sayısına göre 22 ml Reaktif A'dan, 440 μL Reaktif B'den alınarak çalışma reaktifi hazırlandı. Aynı kitin içerisinde bulunan BSA standartından kitin önerileri doğrultusunda 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 ve 25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hazırlanan standartlar kullanıldı. Kör olarak ise PBS kullanıldı. Mikropleyt kuyucuklarına 20 μL standart, kör ve numune eklendi. Her kuyucuğa 200 μL hazırlanan BCA çalışma reaktifi eklendi ve Shel Lab Shaking Incubator cihazında 30 sn karıştırıldı. Daha sonra pleyt kaplanarak 37°C'lık etüvde (Shel Lab Shaking Incubator) 30 dakika bekletildi. Oda sıcaklığına geldikten sonra absorbansları dalga boyu 562 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede (Versa Max Microplate Reader) ölçüldü. Örneklerle ait protein düzeyleri Şekil 5'te verilen standart grafiği ve formül kullanılarak belirlendi. Örneklerdeki protein seviyeleri bu standart eğri yardımı hesaplandı Sonuçlar mg/mL birimi ile ifade edildi.



Şekil 5. Karaciğer dokusunda protein miktarlarının hesaplanmasında kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

3.2.11. Doku örneklerinde GRP78, CHOP, SOD1, GPX1, TNF- α , IL-1 β , IL-4 ve IL-10 Seviyelerinin Belirlenmesi

3.2.11.1. ELISA Yönteminde Uygulanan Basamaklar

ELISA ölçümlerinden önce kit içerikleri oda sıcaklığına getirildi. Ölçümlerde kullanılan doku homojenatları 50 kat seyreltilerek aşağıda adımları verilen üretici firmanın önerdiği kit protokolü uygulandı.

1. Pleyt 2 kez yıkandı.
2. Kendileri için ayrılan kuyucuklara 100 μ L standart, numune ve kör (PBS) eklendi, pleytin üzeri koruyucu ile kaplandı ve 37 °C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyon bitiminde pleyt iki kez yıkandı.
4. Her kuyucuğa 100 μ L Biotin işaretli antikor pipetlendi, pleytin üzeri koruyucu ile kaplandı ve 37 °C'de 1 saat bekletildi.
5. İnkübasyon bitiminde pleyt üç kez yıkandı.
6. Ardından her bir kuyucuk için 100 μ L HRP-Streptavidin konjugat eklendi, pleytin üzeri koruyucu ile kaplandı ve 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonunda pleyt beş kez yıkandı.
8. Yıkama sonrası her kuyucuğa 90 μ L TMB eklendi. 37 °C'de 20 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyon süresi sonunda standartların mavi renge dönüşümünün görülmesi ile

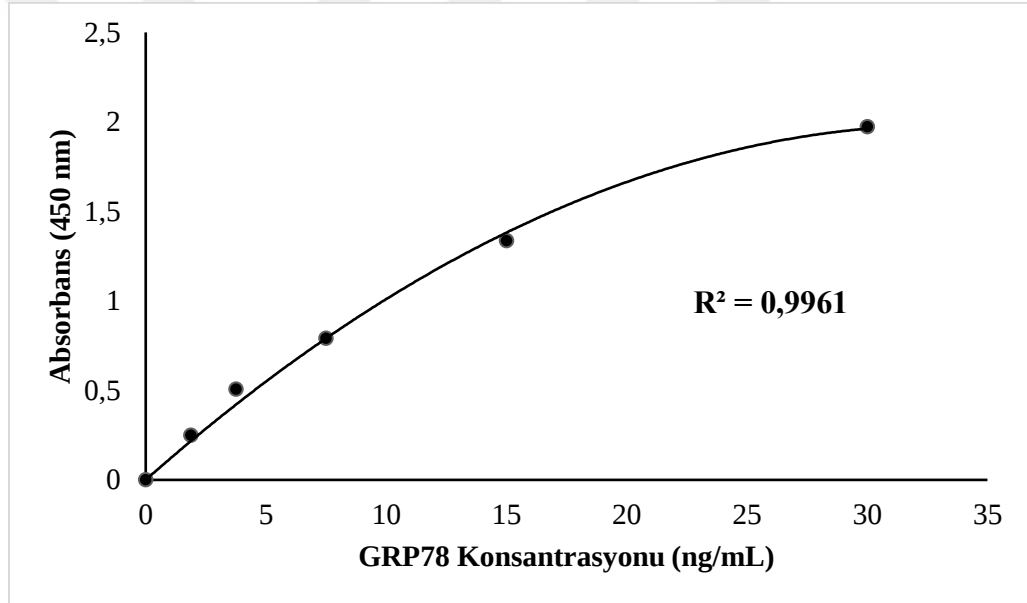
kuyucuklara 50 µL durdurma çözeltisi eklenerek renk reaksiyonu durduruldu.

10. Her kuyucuğa ait absorbans değerleri mikro pleyt okuyucu yardımıyla 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

11. Standart konsantrasyonu-absorbans grafiği çizilerek elde edilen formül yardımıyla örneklerle ait konsantrasyon değerleri hesaplandı.

3.2.12. Doku GRP78 Seviyelerinin Belirlenmesi

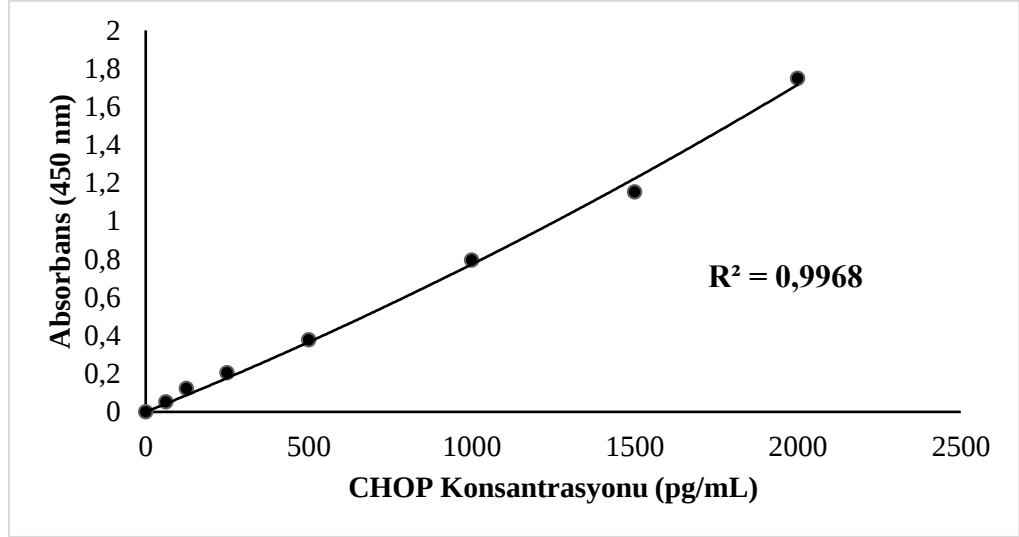
GRP78 düzeyleri, 3.2.11.1’de verilen adımlar takip edilerek kit protokolüne uygun şekilde belirlendi. GRP78 konsantrasyonlarının hesaplanmasında Şekil 6’da verilen standart grafiği yardımıyla elde edilen formül kullanıldı. Sonuçlar ng/mg protein şeklinde ifade edildi.



Şekil 6. GRP78 seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

3.2.13. Doku CHOP Seviyelerinin Belirlenmesi

CHOP düzeyleri, 3.2.11.1’de verilen adımlar takip edilerek kit protokolüne uygun şekilde belirlendi. CHOP konsantrasyonlarının hesaplanmasında Şekil 7’de verilen standart grafiği yardımıyla elde edilen formül kullanıldı. Sonuçlar pg/mg protein şeklinde ifade edildi.



Şekil 7. CHOP seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

3.2.14. Doku Örneklerinde Toplam Oksidan Durum Analizi

Doku örneklerinde TOS düzeyi ölçümünde ticari kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, REF RL0024, Gaziantep, Turkey) kullanıldı. Ölçüm için Tablo 8’de verilen protokol uygulandı. Sonuçlar mikromol hidrojen peroksit eşdeğeri/mg protein olarak verildi.

Tablo 8. Doku TOS ölçüm basamakları

Reaktif	Numune (µL)	Standart (µL)
Standart	-	15
Numune	15	-
*Reaktif 1	100	100
Pleyt kuyucularına standart veya numune ekledikten yaklaşık 30 saniye sonra ELISA okuyucusunda 530 nm dalga boyunda birinci okuma (A ₁) yapıldı.		
**Reaktif 2	5	5
Reaktif 2 eklendikten sonra laboratuvar ortamında 10 dakika bekletildi ve ELISA okuyucusunda 530 nm dalga boyunda ikinci okuma (A ₂) yapıldı.		

* Tampon Çözeltisi, 25 mM, pH’sı 1.75 H₂SO₄, ** Substrat Çözeltisi, 25 mM, pH’sı 1.75 H₂SO₄, 5 mM Fe²⁺ iyonu, 10 mM O-dianizidin

Hesaplama yapılırken her numune ve standart için kaydedilen ikinci absorbens değerinden (A_2) birinci absorbens değeri (A_1) çıkartılarak absorbens farkları elde edildi ($\Delta A = A_2 - A_1$). Sonuçlar “ $(\Delta A_{\text{Numune}} / \Delta A_{\text{Standart}}) \times \text{standart konsantrasyonu}$ ” formülü ile hesaplanarak μmol hidrojen peroksit eşdeğeri/L şeklinde verildi.

3.2.15. Doku Örneklerinde Toplam Antioksidan Durum Analizi

Doku örneklerinde TAS seviyesi ölçümünde ticari kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, REF RL0024, Gaziantep, Turkey) kullanıldı. Ölçüm için Tablo 9’da verilen basamaklar takip edildi. Sonuçlar mmol trolox eşdeğeri /mg protein olarak verildi.

Tablo 9. Doku TAS ölçüm basamakları

Reaktif	Numune (μL)	Standart (μL)	H ₂ O (μL)
Deiyonize edilmiş su	-	-	6
Standart	-	6	-
Numune	6	-	-
*Reaktif 1	100	100	100
Reaktif 1 eklendikten 30 saniye sonra ELISA okuyucusunda 660 nm dalga boyunda ilk absorbens değeri (A_1) okundu.			
**Reaktif 2	15	15	15
Reaktif 2 eklendikten sonra pleyt laboratuvar ortamında 10 dakika bekletildi. ELISA okuyucusunda 660 nm dalga boyunda ikinci absorbens (A_2) değeri okundu.			

* Tampon Çözeltisi, 0.4 mol/L pH’sı 5.8 Asetat Tamponu, ** Prokromojen Çözeltisi, 0.4 mol/L pH’sı 3.6 Asetat Tamponu, 30 mmol/L ABTS

Hesaplama yapılırken her numune ve standart için kaydedilen ikinci absorbens değerinden (A_2) birinci absorbens değeri (A_1) çıkartılarak absorbens farkları elde edildi ($\Delta A = A_2 - A_1$). Pozitif kontrol için pleyt kuyucuklarına H₂O pipetlendi. Sonuçlar “ $[(\Delta A_{\text{H}_2\text{O}}) - (\Delta A_{\text{Numune}})] / [(\Delta A_{\text{H}_2\text{O}}) - (\Delta A_{\text{Standart}})] \times \text{standart konsantrasyon}$ ” formülüne göre hesaplandı ve mmol trolox eşdeğeri /mg protein cinsinden ifade edildi.

3.2.16. Doku Örneklerinde OSI Hesaplanması

OSI değerleri aşağıda verilen formül kullanılarak belirlendi (145).

$$\text{OSI (keyfi birim)} = [\text{TOS (mikromol hidrojen peroksit eşdeğeri/L)} / (\text{TAS (mmoL trolox eşdeğeri/L)})] \times 100$$

3.2.17. Doku MDA Seviyelerinin Belirlenmesi

Doku MDA ölçümü Mihara ve Uchiyama tarafından geliştirilen yöntemin modifiye edilmesi ile yapıldı (147). MDA ölçümü için gerekli çözeltiler aşağıda, ölçüm basamakları Tablo 10’da standart grafiği ise Şekil 8’de verilmiştir.

%1’ lik Fosforik asit (H_3PO_4): Beher içerisine 50 mL saf su koyuldu, üzerine %85’ lik H_3PO_4 ’ten 2.94 mililitre eklendi ve son hacim saf su ile 250 mL’ye tamamlandı.

TBA Çözeltisi: Mezür yardımıyla ölçülen 50 mL saf su balon joje içerisine koyuldu. Şişede muhafaza edilen TBA’dan 0.67 gram tartılarak aynı balon jojeye aktarıldı ve içerisine manyetik bir bar atıldı. Isıtıcı fonksiyonu bulunan karıştırıcıda yaklaşık 20 dakika düşük ısıda karıştırılması sağlandı. Çözelti karıştırıcı üzerinden alınarak soğuyana kadar beklendi ve üzerine 50 mL asetik asit ilave edildi.

Standart çözeltiler: 100 nmol/mL’lik MDA stok çözeltisi hazırlanarak bu çözeltilerden 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 nmol/mL’lik standart çözeltiler seri seyreltme yapılarak hazır edildi.

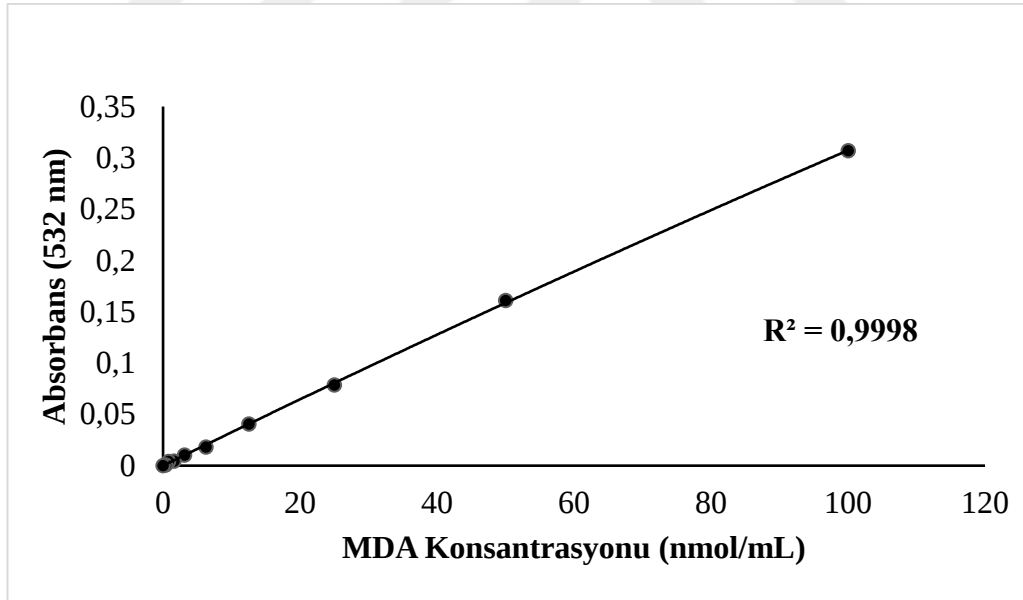
Tablo 10. Doku MDA ölçüm basamakları

Reaktif	Hacim (µL)
Numune, Standart, Kör	500
%1'lik H ₃ PO ₄ Çözeltisi	3000
TBA Çözeltisi	1000

Cam tüpler içerisine çözeltiler ekledi ve metal raklara yerleştirilerek folyo ile kaplandı. Önceden 100 °C'ye ayarlanmış inkübatörde 45 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.

4000 rpm'de 10 dakika satrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

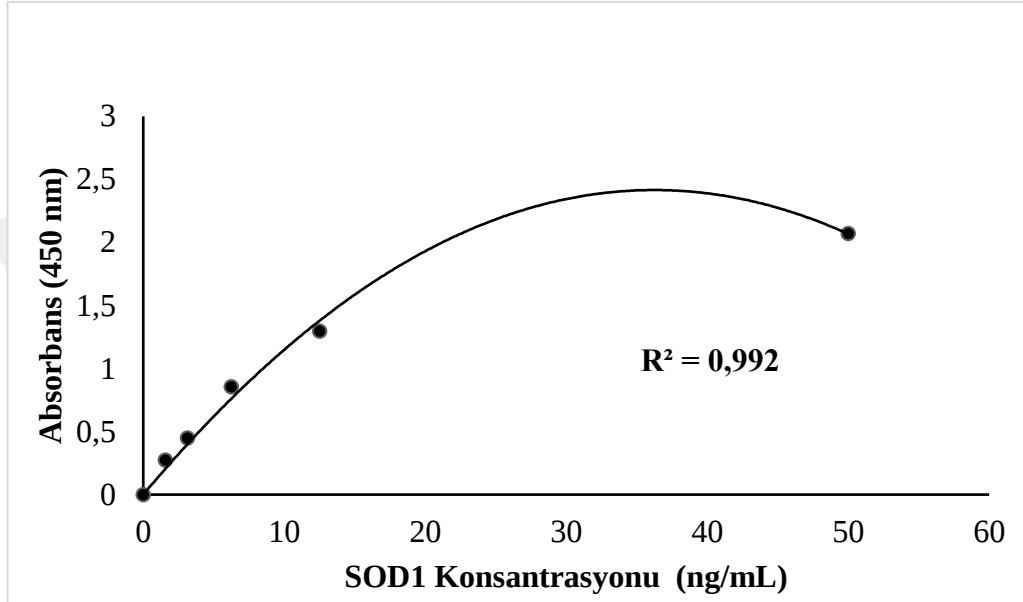
200 mikrolitre örnek (numune, standart, kör) pleyte aktarıldı. Spektrofometrik ölçüm yapan cihaz 532 nm ayarladı ve absorbans değeri okutuldu.



Şekil 8. Doku MDA seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

3.2.18. Doku SOD1 Seviyelerinin Belirlenmesi

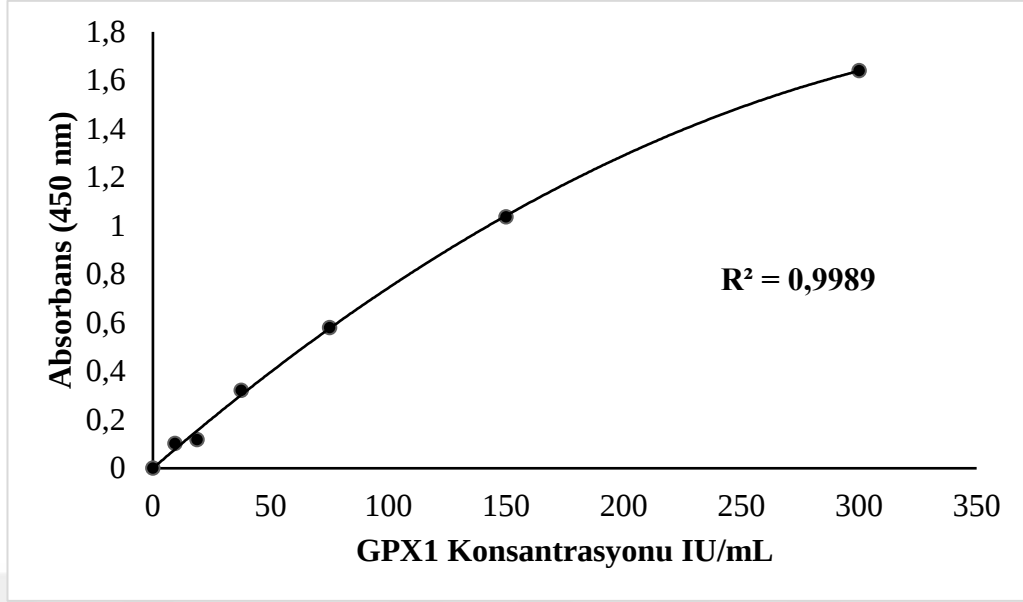
SOD1 düzeyleri, 3.2.11.1’de verilen adımlar takip edilerek kit protokolüne uygun şekilde belirlendi. Örneklere ait SOD1 konsantrasyonlarının hesaplanmasında Şekil 9’da verilen standart grafiği yardımıyla elde edilen formül kullanıldı. Sonuçlar ng/mg protein şeklinde değerlendirildi.



Şekil 9. SOD1 seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

3.2.19. Doku GPX1 Seviyelerinin Belirlenmesi

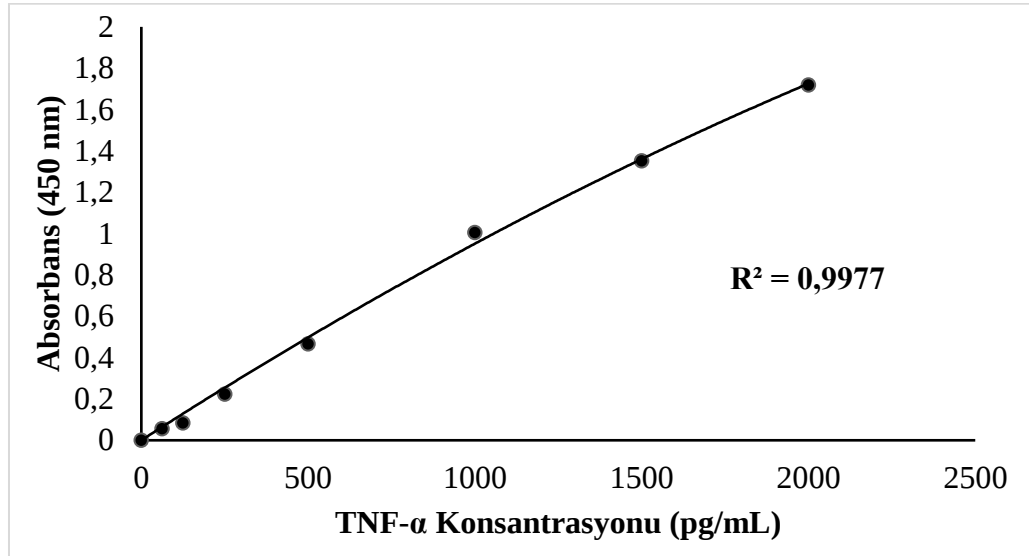
GPX1 düzeyleri, 3.2.11.1’de verilen adımlar takip edilerek kit protokolüne uygun şekilde belirlendi. Örneklere ait GPX1 konsantrasyonlarının hesaplanmasında Şekil 10’da verilen standart grafiği yardımıyla elde edilen formül kullanıldı. Sonuçlar IU/mg protein şeklinde verildi.



Şekil 10. GPX1 seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

3.2.20. Doku TNF- α Seviyelerinin Belirlenmesi

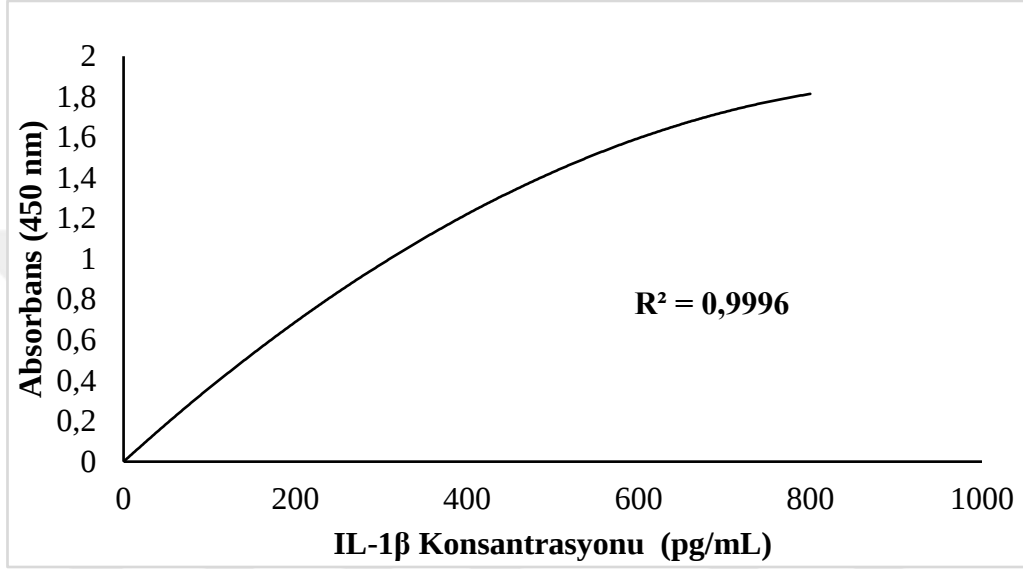
TNF- α düzeyleri, 3.2.11.1’de verilen adımlar takip edilerek kit protokolüne uygun şekilde belirlendi. Örneklere ait TNF- α konsantrasyonlarının hesaplanmasında Şekil 11’de verilen standart grafiği yardımıyla elde edilen formül kullanıldı. Sonuçlar pg/mg protein şeklinde verildi.



Şekil 11. TNF- α seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

3.2.21. Doku IL-1 β Seviyelerinin Belirlenmesi

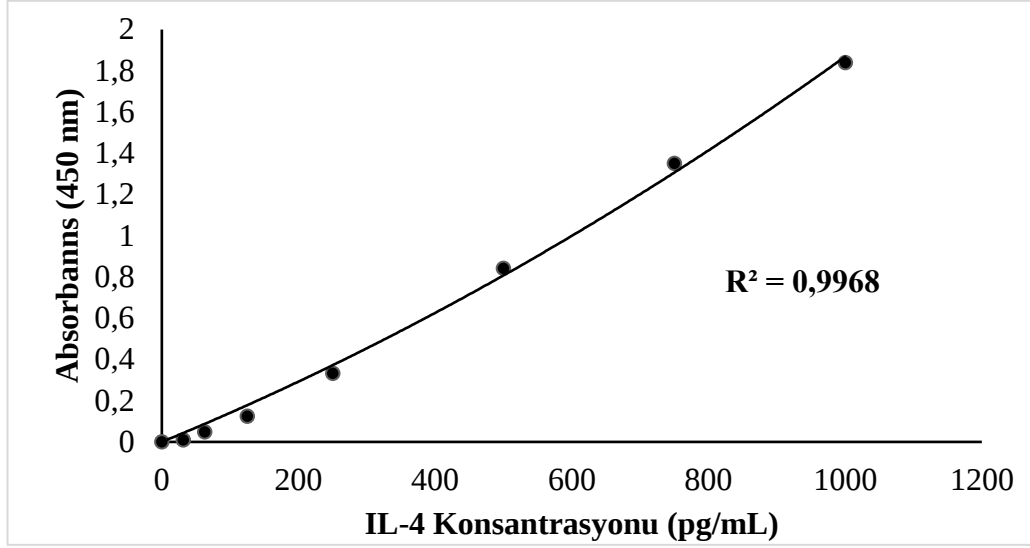
IL-1 β düzeyleri, 3.2.11.1’de verilen adımlar takip edilerek kit protokolüne uygun şekilde belirlendi. Örneklere ait IL-1 β konsantrasyonlarının hesaplanmasında Şekil 12’de verilen standart grafiği yardımıyla elde edilen formül kullanıldı. Sonuçlar pg/mg protein şeklinde verildi.



Şekil 12. IL-1 β seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

3.2.22. Doku IL-4 Seviyelerinin Belirlenmesi

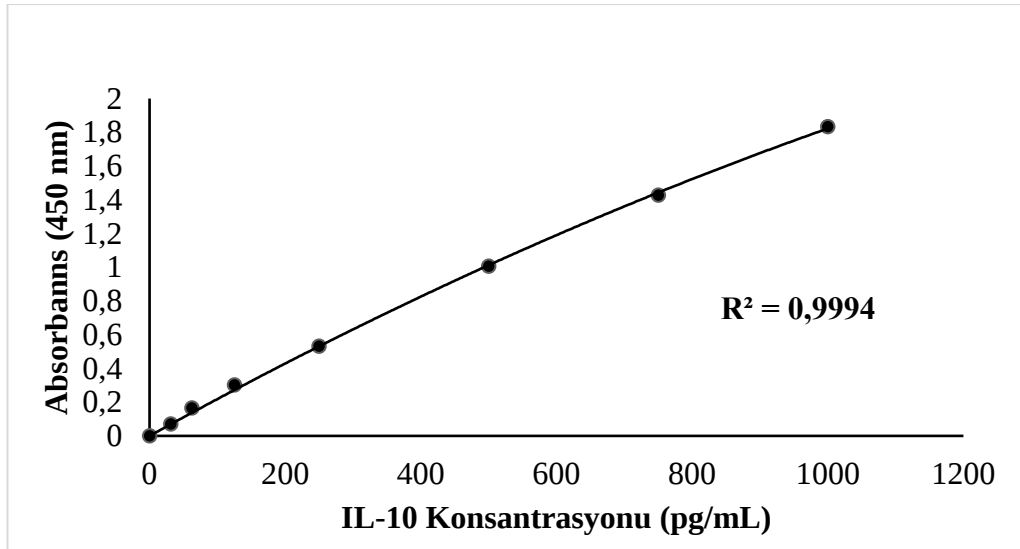
IL-4 düzeyleri, 3.2.11.1’de verilen adımlar takip edilerek kit protokolüne uygun şekilde belirlendi. Örneklere ait IL-4 konsantrasyonlarının hesaplanmasında Şekil 13’te verilen standart grafiği yardımıyla elde edilen formül kullanıldı. Sonuçlar pg/mg protein şeklinde verildi.



Şekil 13. IL-4 seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

3.2.23. Doku IL-10 Seviyelerinin Belirlenmesi

IL-10 düzeyleri, 3.2.11.1’de verilen adımlar takip edilerek kit protokolüne uygun şekilde belirlendi. Örneklere ait IL-10 konsantrasyonlarının hesaplanmasında Şekil 14’te verilen standart grafiği yardımıyla elde edilen formül kullanıldı. Sonuçlar pg/mg protein şeklinde verildi.



Şekil 14. IL-10 seviyesinin belirlenmesinde kullanılan konsantrasyon-absorbans eğrisi

3.2.24. Karaciğer İndeksi Hesaplanması

Kesim esnasında karaciğer dokusu normal serum fizyolojik ile yıkandı. Filtre kağıdı ile fazla su emildikten sonra, karaciğer indeksini hesaplamak için tartıldı. Karaciğer indeksi literatüre uyarlanarak hesaplandı. Aşağıda indeks hesaplama formülü verilmiştir:

Karaciğer indeksi = [karaciğer ağırlığı (g) / bireysel vücut ağırlığı (g)]x100 (148, 149).

3.3. Doku Örneklerinde Gen Ekspresyon Analizleri

3.3.1. Karaciğer Dokularından Total RNA İzolasyonu

Karaciğer dokularından total RNA izolasyonu aşağıda verilen basamaklara göre gerçekleştirildi:

1. Yaklaşık 100 mg karaciğer dokusu, ribonükleaz ve deoksiribonükleaz içermeyen ependorflara konuldu. Üzerine 1 mililitre TRIpure izolasyon çözeltisi eklendi. Doku örnekleri el tipi homojenizatör kullanılarak 6000 rpm'de 15 sn süreyle homojenizasyon işlemine tabi tutuldu.
2. Elde edilen homojenat 5 dk laboratuvar ortamında bekletildi.
3. Üzerine 200 µL kloroform ilave edildi, el ile 15 saniye güçlü bir şekilde çalkalandı.
4. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi ve ardından +4 °C'de, 12000 g'de, onbeş dakika süre ile santrifüj işlemine tabi tutuldu.
5. Oluşan üst faz ribonükleaz içermeyen başka bir ependorfa aktarıldı. Üzerine 500 µL izopropanol eklendi. Birkaç kez alt üst edilerek iyice karışması sağlandı.
6. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Ardından +4 santigrat derecede 12000 g'de 10 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj sonrası elde edilen üst faz atıldı.
7. % 75'lik etil alkol çözeltisinden 1 mL ilave edildi ve pellet çözünene kadar vortekslendi.
8. +4 °C'de, 7500 g'de, beş dakika süre ile santrifüj işlemine tabi tutuldu. Süpernatant atıldı. Fazla alkolün uzaklaştırılması için ependorfların kapakları açıldı ve etanolün uçması sağlandı.
9. Elde edilen RNA pelletlerinin üzerine daha önce hazırlanan elli mikrolitre kadar DEPC'li su ilave edildi ve onbeş dakika boyunca elli beş santigrat derecede inkübasyon işlemine tabi tutuldu. İnkübasyon sonrası RNA derişimi (ng/µL) ve saflığı nanodrop cihazında belirlendi.

3.3.2. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzole edilen RNA örnekleri bekletilmeden cDNA'ya dönüştürüldü. RNA konsantrasyonları belirlendikten sonra konsantrasyonların eşitlenmesi için dietil pirokarbonat (DEPC)'lı su ile seyreltme yapıldı. RNA'nın cDNA'ya dönüşümünde hazır kit ve kitin içerisindeki bileşenler kullanıldı. Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın ve kullanılan tüm malzemelerin steril olmasına dikkat edildi. 1.5 mL hacimde konik şeklinde steril ependorf tüpler kullanılarak reaksiyon ortamı hazırlandı. cDNA sentezi için kullanılan reaktifler Tablo 11'de verildi.

Tablo 11. cDNA sentezi için gerekli reaktifler ve kullanılan hacimler

Reaktif	Hacim (µL)
Su	1
Tampon	4
RNAz İnhibitörü	0.5
dNTP Karışımı (10 mM)	2
Random Hekzamer Primer	2
Ters Transkriptaz (20 U/µL)	0.5

250 µL hacimde steril küçük boy ependorf tüpler içerisine hazırlanan reaksiyon karışımından 10 µL otomatik pipet ile steril uç kullanılarak eklendi. Karışım eklendikten sonra her tüpe üzerinde yazılı numuneye ait olan ve konsantrasyonu eşit hale getirilmiş RNA'dan steril uç kullanılarak 10 µL ekledi. Daha önceden açılan ve program seçimi (25 °C'de on dakika, 55 °C'de 30 dakika ve 85 °C'de beş dakika) yapılan PCR cihazına ependorf tüpler kapakları kapatılarak yerleştirildi. Reaksiyon sonunda meydana gelen cDNA konsantrasyonları (ng/µL) ve saflığı nanodrop cihazında belirlendi. Elde edilen ürünlerin gen ekspresyon analizleri yapılana kadar -80 °C'de saklandı.

3.3.3. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu Protokolü

Real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), DNA amplifikasyonu ile aynı zamanda artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile birlikte kantitatif çıktı alınabilen bir PCR metodudur (150). Kantitatif RT-PCR metodunda bir numune için her reaksiyonda oluşan floresan sinyallerin bilgisayarda sayısal değerlere dönüşümü sağlanır (151). Floresan sinyali oluşturmak için DNA çift sarmalına bağlanabilen SYBR® Green boyası kullanımı en yaygın yaklaşımlar arasında yer alır. Boya çift zincirli DNA'ya bağlanarak çoğalan DNA miktarında artışla eş zamanlı floresan ışımı yapar (152). Çalışmamızda da SYBR Green I Master kiti (HibriGen, ürün kodu: 1119-UB-698, Türkiye) kullanıldı. Tablo 12'de kullandığımız primer dizileri verildi.

Tablo 12. RT-PCR'da kullanılan gen ve primer dizileri

Gen Adı	Primer	Primer Dizisi
Fare β -Aktin (Actb)	İleri primer	5'- CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C -3'
	Geri primer	5'- ACC GAT CCA CAC AGA GTA CTT G -3'
Fare GRP78 (Hspa5)	İleri primer	5'- AGA GCC TTG TCT TCT CAG CAT C -3'
	Geri primer	5'- CAA CAC TTT CTG GAC AGG CTT C -3'
Fare CHOP (Ddit3)	İleri primer	5'- CAA GCA TGA ACA GTG GGC ATC -3'
	Geri primer	5'- TGT ACC GTC TAT GTG CAA GCC -3'

RT-PCR aşamasında, 1.5 mL hacimde steril RNaz/DNaz içermeyen tüplerde; GRP78 ile CHOP ve referans gen olan β -aktin için ayrı reaksiyon ortamları oluşturmak için Tablo 13'te verilen reaktifler kullanıldı.

Tablo 13. RT-PCR aşaması için gerekli reaktifler ve kullanılan hacimler

Reaktif	Hacim (μL)
Su	3
İleri Primer	1
Geri Primer	1
Master Karışım (2x)	10
TOPLAM	15

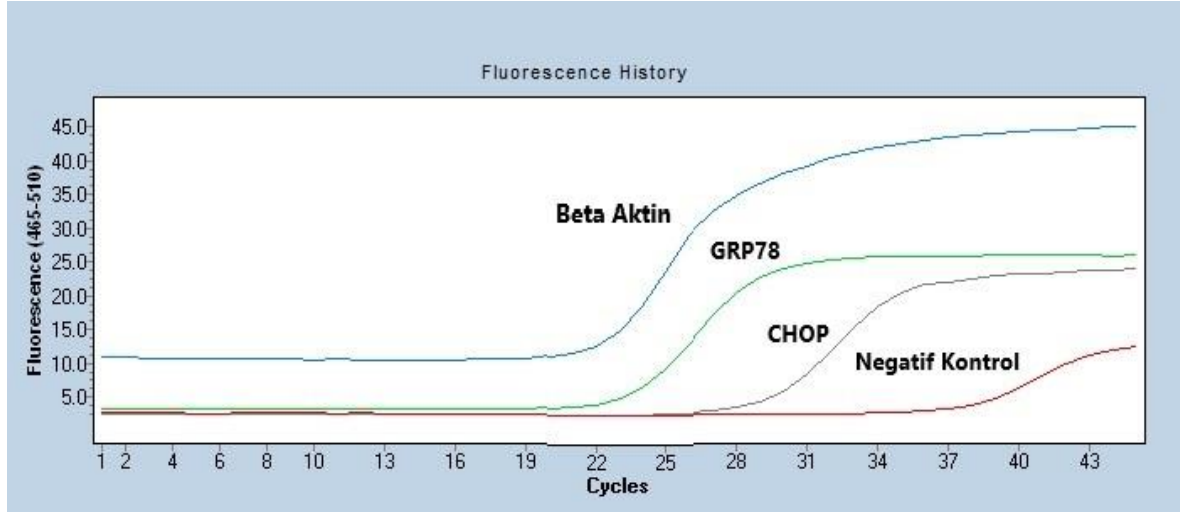
Steril 96 kuyucuklu pleytte her bir numune için hedef ve referans gen iki reaksiyon olacak şekilde çalışıldı. Pleytte bazı kuyucuklar negatif kontrol olarak seçilen PCR saflığında su için ayrıldı. Pleytteki kuyucuklara Tablo 13'te verilen reaksiyon karışımından 15 μ L eklendi. Pleyte eklenen reaksiyon karışımı üzerine ilgili numuneye ait cDNA'dan 5 μ L eklendi (son hacim 20 μ L). Pleyt kaplama folyosu ile örtüldü. RT-PCR işlemi tablo 14'te verilen sıcaklık ve sürelerle göre göre SYBR Green I floresan ile LightCycler® 480 II cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 14. Çalışmada kullandığımız RT-PCR protokolü

Program	Döngü	Analiz Modu
Ön İnkübasyon	1	Yok
Amplifikasyon	55	Miktar Tayini
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi
Soğuma	1	Yok

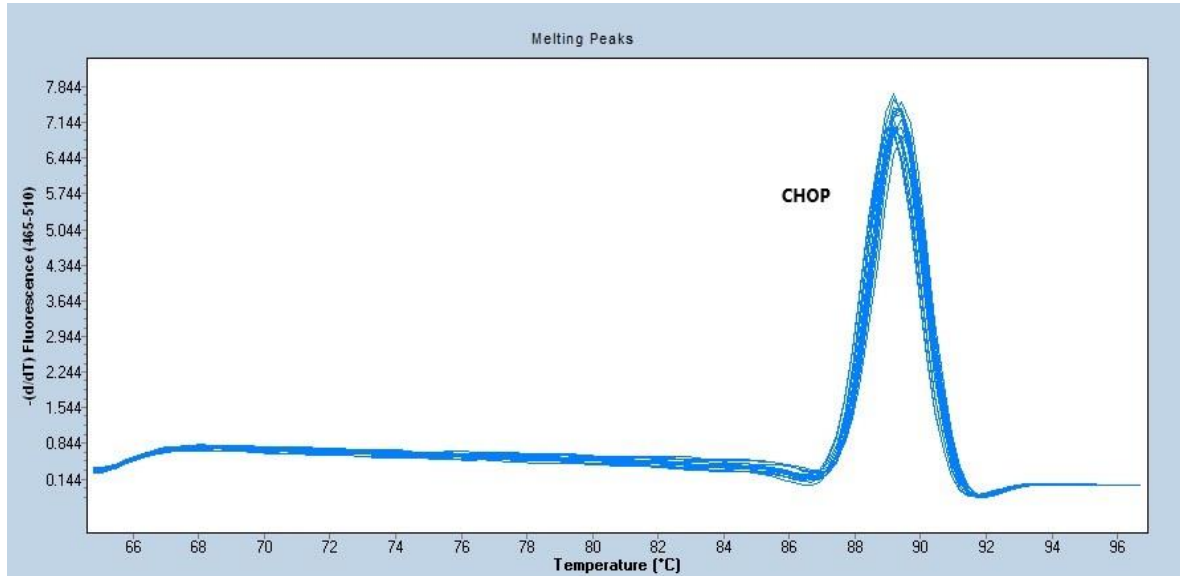
Hedef Sıcaklık[°C]	Elde Etme Metodu	Süre [saat: dk: s]	Sıcaklık [°C/s]	artışı
Ön İnkübasyon				
95	Yok	00:15:00	4.4	
Amplifikasyon				
95	Yok	00:00:10	4.4	
62	Yok	00:00:20	2.2	
72	Tek	00:00:20	4.4	
Erime Eğrisi				
95	Yok	00:00:05	4.4	
65	Yok	00:01:00	2.2	
97	Sürekli	Yok	0.11	
Soğuma				
40	Yok	00:00:10	1.5	

RT-PCR çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz amplifikasyon eğrileri örneği Şekil 15'te verildi.



Şekil 15. Beta aktin, GRP78, CHOP ve negatif kontrol (PCR saflığında su) için amplifikasyon eğrileri.

RT-PCR çalışmamızdan elde ettiğimiz erime eğrisi grafikleri arasından seçtiğimiz bir örnek Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16. RT-PCR'da elde ettiğimiz erime eğrisi grafiği örneği (CHOP geni)

3.3.4. Gen Ekspresyon Sonuçlarının Hesaplanması

Ekspresyon sonrası yapılan hesaplamalar, çeşitli yöntemlerle belirlenen farklı döngülerin karşılaştırılmasına dayanır (153). Gen ekspresyon çalışmamızın analizi için rölatif miktar tayini metodu tercih edildi. Bu metotta, floresan değerlerinin eşik değerini aştığı nokta olan eşik döngüsü veya geçiş noktası noktası olarak isimlendirilen kısaltması cp olan değerler kullanılır (154). Cihazın hesapladığı verimlilik değerinin 2 bulunması sebebiyle de rölatif tayinde Livak ve Schmittgen tarafından geliştirilen ve aşağıda verilen $2^{-\Delta\Delta C_p}$ formülüne göre gen ekspresyon analizleri gerçekleştirildi (153, 155).

$$R = 2^{-[\Delta C_p \text{ hedef} - \Delta C_p \text{ kontrol}]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$$

Tüm gruplarda her bir numunenin ikişerli çalışılmasıyla, her bir gene ait iki adet Cp değeri elde edildi ve bu Cp değerlerine ait ortalama alındı. Kontrol seçilen grubun ortalama Cp değerine göre de diğer grupların değişimi yukarıda verilen formül kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar kat şeklinde ifade edildi.

3.4. Histolojik Analizler

3.4.1. Işık Mikroskopunda Görüntüleme Öncesi Dokuların Hazırlık Aşaması ve Kesitlerin Alınması

Kesim esnasında histopatolog tarafından teslim alınan karaciğer dokusunun takip, kesit alınma ve boyama işlemleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi (Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi). Gruplara ait karaciğere ait dokularının ışık mikroskopunda incelenebilmesi için %10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde 48 saat süreyle fikzasyonu yapıldı. Yükselen alkol serilerinden (%80, %96, %96, %100) geçirildi ve dehidrasyonu sağlandı. Kesimde şeffaflaştırılması yapıldı ve parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2255, Tokyo, Japan) ile 4-5 µm kalınlığında kesitler görüntülenmek üzere lam üzerine alındı.

3.4.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Kesitlerde genel histolojik yapının gözlemlenmesi amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi kullanıldı. Preparatlar bu konuda deneyim sahibi ve çalışma gruplarını bilmeyen histolog tarafından ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi. Preparatların değerlendirilmesinde histoloji laboratuvarında bulunan Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) mikroskop kullanıldı. Mikroskoba bağlı kamera ataçmanı (Olympus DP71; Olympus, Tokyo, Japan) yardımıyla elde edilen bulgular fotoğraflanarak kaydedildi.

Gruplara ait karaciğer dokuları genel histopatolojik açıdan değerlendirildi. Ayrıca karaciğer kesitlerine hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon, genişlemiş sinüzoidlerde konjesyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından yarıkantitatif olarak skorlaması yapıldı. Her bir kriter açısından 0-3 arasında skorlama yapıldı. Skorlamada 0: Hiç yok; 1: hafif; 2: orta ve 3: şiddetli olarak değerlendirildi (156).

3.5. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versiyon 23 (NY, Amerika) yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunlukları “Kolmogorov Smirnov” testi ile analiz edildi. Ölçülen parametrelere ait değerlerin normal dağılım gösterdiği belirlendiğinden bu parametreler gruplar arasında tek yönlü “ANOVA” testi kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunan durumlarda ikişerli karşılaştırmalar (post-hoc) “Tukey” testi kullanılarak yapıldı. Her bir grubun kilo değişkeninin karşılaştırılmasında tek yönlü tekrarlı ölçümler varyans analizi (Repeated measures ANOVA) testi kullanıldı. Değişkenlerimiz normal dağılım gösterdiği için tanımlayıcı analizler ortalama ve ortalamanın standart hatası kullanılarak verildi. p değerinin 0.05’in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Gruplara Ait Ağırlıklar ve Karaciğer İndeksleri

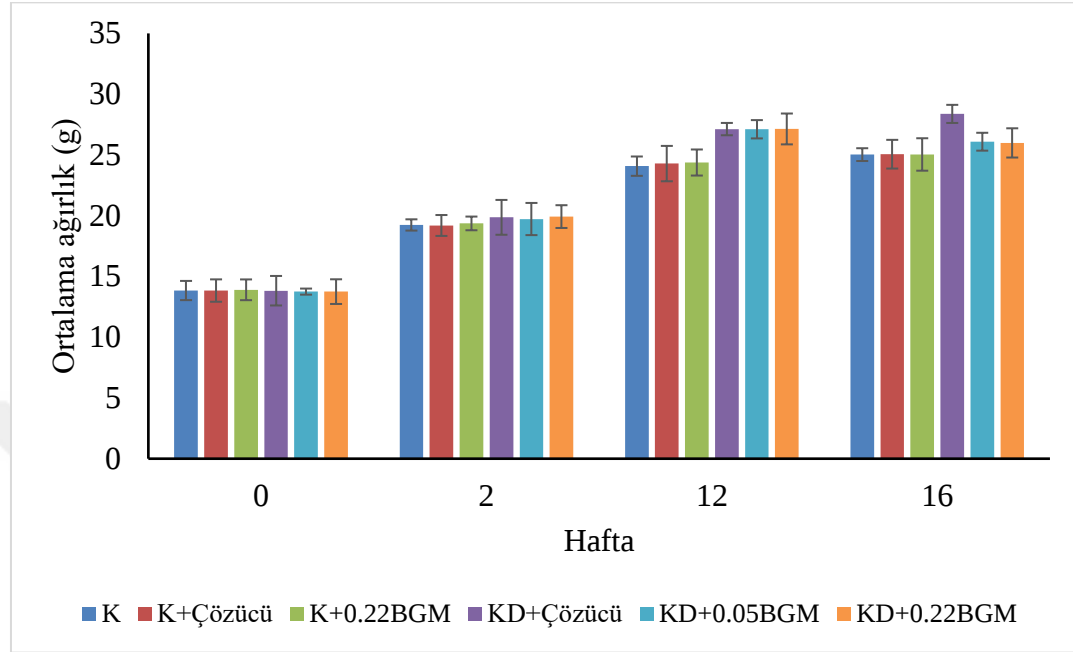
Fareler gruplarına göre laboratuvar tipi kemirgen yemi ve kafeterya diyeti ile 16 hafta boyunca beslendiler. Bu süre içerisinde farelerin başlangıç, ikinci, on ikinci ve on altıncı haftalardaki kiloları ölçüldü ve deney sonunda karaciğer indeksleri hesaplandı.

Tablo 15. Deney gruplarının ağırlık değişimleri ortalamaları ve karaciğer indeksleri

Parametreler	Zaman	Deney Grupları					
		K	K+Çözücü	K+0.22BGM	KD+Çözücü	KD+0.05BGM	KD+0.22BGM
Ağırlık (g)	Başlangıç	13.89±0.28	13.84±0.33	13.87±0.30	13.83±0.36	13.82±0.09	13.86±0.43
	2. Hafta	19.24±0.16	19.19±0.30	19.36±0.20	19.86±0.33	19.73±0.47	19.93±0.51
	12. Hafta	24.08±0.28	24.29±0.51	24.38±0.38	27.13±0.45 ^{a,b,c}	27.11±0.2 ^{a,b,c}	27.14±0.1 ^{a,b,c}
	16. Hafta	25.03±0.19	25.06±0.42	25.04±0.47	28.38±0.43 ^{a,b,c}	26.09±0.26 ^{a,d}	25.99±0.26 ^{a,d}
Karaciğer İndeksi		4.54±0.09	4.54±0.06	4.40±0.18	5.14±0.16 ^{a,b,c}	5.12±0.20 ^c	4.71±0.10

Sonuçlar ortalama ± SEM (ortalamanın standart hatası) şeklinde verildi. [^a K grubuna göre anlamlı, ^b K+Çözücü grubuna göre anlamlı, ^c K+0.22BGM grubuna göre anlamlı, ^d KD+Çözücü grubuna göre anlamlı fark görüldü (p<0.05).]

Besleme periyodu boyunca gruplara ait ortalama ağırlık değişim grafiği Şekil 17 'de gösterilmiştir.



Şekil 17. Deney gruplarında ortalama ağırlık-hafta değişim grafiği

Çalışmada yer alan farelerin hem başlangıç hem de ikinci hafta ağırlıkları değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). On ikinci hafta ağırlıkları karşılaştırıldığında kontrol, K+Çözücü ve K+0.22BGM gruplarına ait değerler arasında fark bulunamazken ($p>0.05$), kafeterya diyeti verilen gruplara ait değerlerin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek oldukları bulundu ($p=0.0001$). KD verilen gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). On altıncı hafta ağırlıklarına bakıldığında kontrol grubuna ait değer ile K+Çözücü, K+0.22BGM, KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM gruplarına ait değerler arasında fark olmadığı ($p>0.05$) KD+Çözücü grubuna ait değer ise anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü ($p=0.0001$). Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM uygulanan kafeterya gruplarına ait 16. hafta ağırlıklarının BGM uygulanmayan KD+Çözücü grubuna göre azaldığı görüldü ($p<0.05$). KD ile beslenen ve farklı konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan grupların 16. hafta ağırlıkları arasında ise anlamlı fark olmadığı izlendi ($p=1$).

Gruplara ait karaciğer indeksi değerleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna ait değer ile K+Çözücü ($p=1$), K+0.22BGM ($p=0.981$), KD+0.05BGM ($p=0.061$) ve KD+0.22BGM ($p=0.955$) gruplarına ait değerler arasında fark olmadığı, KD+Çözücü grubuna ait değer ise yüksek olduğu görüldü ($p=0.046$). KD+Çözücü grubuna kıyasla KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM gruplarının KC indeksi değerlerinin sayısal olarak azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (sırasıyla $p=1$, $p=0.274$). Kafeterya diyeti ile beslenen düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM verilen grupların karaciğer indeksi değerleri arasında da anlamlı bir fark görülmedi ($p=1$).

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Serumda Ölçülen Rutin Biyokimyasal Parametrelerin Düzeyleri

Gruplarda 12 saat açlık sonrası ölçülen serum glukoz, TAG, T-K, ALT, AST, insülin ve HOMO-IR düzeylerinin değerlendirilmesi Tablo 16'de verildi.

Açlık serum glukoz değerlerinin kontrol grubuna göre K+Çözücü ($p=0.019$), KD+Çözücü ($p=0.0001$) ve KD+0.05BGM ($p=0.0001$) gruplarında anlamlı yüksek olduğu, K+0.22BGM ($p=1$) ve KD+0.22BGM ($p=0.964$) gruplarında ise bir fark olmadığı bulundu. Kafeterya diyeti ile beslenip düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan gruplardaki açlık serum glukoz değerlerinin KD+Çözücü grubuna göre düşük olduğu ($p=0.0001$), ayrıca KD+0.22BGM grubuna ait değerlerinde KD+0.05BGM grubuna ait değerlerden daha düşük olduğu belirlendi ($p=0.005$).

Serum trigliserit düzeyleri değerlendirildiğinde, kontrol grubuna ait değerler ile K+Çözücü ($p=0.999$), K+0.22BGM ($p=1$) ve KD+0.22BGM ($p=0.621$) gruplarına ait değerler arasında fark yokken, KD+Çözücü ($p=0.0001$) ve KD+0.05BGM ($p=0.002$) gruplarına ait değerlerin anlamlı yüksek olduğu bulundu. KD tüketen gruplar içerisinde yüksek ve düşük konsantrasyonda BGM takviyesi verilen farelerin serum trigliserit düzeylerinin BGM almayan farelerin trigliserit düzeylerinden daha düşük olduğu belirlendi ($p=0.0001$). Kafeterya diyeti ile beslenip farklı konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan gruplar arasında ise bir fark görülmedi ($p=0.122$).

Total kolesterol düzeyleri karşılaştırıldığında, kontrol grubuna ait T-K değerlerine göre K+Çözücü ($p=0.123$) ve K+0.22BGM ($p=0.996$) gruplarına ait T-K değerlerinde fark yoktu; ancak KD+Çözücü ($p=0.0001$), KD+0.05BGM ($p=0.0001$) ve KD+0.22BGM ($p=0.0001$) gruplarında serum T-K değerleri istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Kafeterya

diyeti ile beslenen gruplar irdelendiğinde ise KD+Çözücü grubuna göre KD+0.22BGM takviyesi alan grubun serum T-K düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı ($p=0.001$), fakat KD+0.05BGM alan grupta bir değişiklik olmadığı görüldü ($p=0.188$). Serum T-K düzeyleri açısından KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM grupları arasında ise fark görülmedi ($p=0.188$).

Serum ALT düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubuna ait değerlere göre K+Çözücü ($p=1$), K+0.22BGM ($p=1$) ve KD+0.22BGM ($p=0.663$) gruplarına ait değerlerde fark yokken, KD+Çözücü ($p=0.0001$) ve KD+0.05BGM ($p=0.002$) gruplarına ait değerlerin anlamlı yüksek olduğu bulundu. KD+Çözücü grubuna kıyasla KD+0.05BGM ($p=0.0001$) ve KD+0.22BGM ($p=0.0001$) gruplarına ait serum ALT düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı görüldü. Kafeterya diyeti ile beslenen düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM verilen grupların serum ALT seviyeleri arasında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.123$).

Serum AST seviyeleri değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre K+0.22BGM grubunda fark görülmezken ($p=1$), K+Çözücü, KD+Çözücü, KD+0.05BGM, KD+0.22BGM gruplarında serum AST değerlerinin anlamlı yüksek oldukları bulundu ($p=0.0001$). KD tüketen düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi uygulanan grupların serum AST düzeylerinin ise KD+Çözücü grubuna ait serum AST düzeylerinden düşük olduğu ($p=0.0001$), ayrıca KD+0.22BGM grubuna ait değerlerin de KD+0.05BGM grubuna ait değerlerinden daha düşük seyrettiği belirlendi ($p=0.0001$).

Serum insülin değerleri irdelendiğinde kontrol grubuna ait değerlere göre K+Çözücü ($p=0.999$), K+0.22BGM ($p=1$), KD+0.05BGM ($p=0.716$) ve KD+0.22BGM ($p=0.849$) gruplarında fark yokken, KD+Çözücü ($p=0.0001$) grubuna ait değerlerin anlamlı yüksek olduğu bulundu. Kafeterya diyeti ile beslenen gruplar karşılaştırıldığında ise KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM gruplarına ait insülin düzeylerinin KD+Çözücü grubuna ait insülin düzeylerine kıyasla azaldığı ve bu azalmanın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.0001$). Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan kafeterya grupları farelerine ait serum insülin düzeyleri arasında ise fark olmadığı görüldü ($p=1$). Gruplara ait HOMA-IR skorları karşılaştırıldığında, kontrol grubuna ait değerlere göre K+Çözücü ($p=1$), K+0.22BGM ($p=0.999$) ve KD+0.22BGM ($p=0.914$) gruplarına ait değerler arasında fark bulunmazken, KD+Çözücü ($p=0.0001$) grubuna ait değerlerin anlamlı yüksek olduğu bulundu.

KD ile beslenip 0.05 ve 0.22 mg/kg konsantrasyonlarında BGM takviyesi verilen gruplardaki HOMA-IR skorlarının KD+Çözücü grubundan daha düşük olduğu görüldü (p=0.0001). KD+0.22BGM ve KD+0.05BGM gruplarına ait HOMA-IR skorları karşılaştırıldığında KD+0.22BGM grubuna ait değerlerinde KD+0.05BGM grubuna ait değerlerden daha düşük olduğu belirlendi (p=0.001).

Tablo 16. Gruplara ait glukoz, TAG, T-K, ALT, AST, insülin ve HOMO-IR düzeyleri

Parametreler	Deney Grupları					
	K	K+Çözücü	K+0.22BGM	KD+Çözücü	KD+0.05BGM	KD+0.22BGM
Glukoz (mg/dL)	161±2.23	171±2.03 ^a	160±1.94 ^b	213±1.6 ^{a,b,c}	174±1.9 ^{a,c,d}	163±2.3 ^{d,e}
TAG (mg/dL)	65±1.21	66±52.40	66±2.06	111±2.8 ^{a,b,c}	78±1.9 ^{a,b,c,d}	70±2.7 ^d
T-K (mg/dL)	79±1.15	83±1.05	78±0.86 ^b	138±1.5 ^{a,b,c}	133±1.4 ^{a,b,c}	130±1.5 ^{a,b,c,d}
ALT (U/L)	33±0.9	34±1.0	33±0.8	48±0.8 ^{a,b,c}	39±1.5 ^{a,b,c,d}	36±1.0 ^d
AST (U/L)	158±0.8	178±1.3 ^a	158±1.4 ^b	270±1.6 ^{a,b,c}	204±1.8 ^{a,b,c,d}	190±0.9 ^{a,b,c,d,e}
İnsülin (ng/mL)	13±0.43	13±0.52	13±0.43	20±0.53 ^{a,b,c}	14±0.5 ^d	14±0.3 ^d
HOMA-IR	104±1.0	105±1.2	104±1.0	234±2.9 ^{a,b,c}	137±2.0 ^{a,c,d}	106±0.9 ^{d,e}

Sonuçlar ortalama± SEM şeklinde verildi. [^a K grubuna göre anlamlı, ^b K+Çözücü grubuna göre anlamlı, ^c K+0.22BGM grubuna göre anlamlı, ^d KD+Çözücü grubuna göre anlamlı, ^e KD+0.05BGM grubuna göre anlamlı fark görüldü (p<0.05).]

4.2.2. Doku CHOP ve GRP78 Düzeyleri

Deney gruplarına ait doku CHOP ve GRP78 değerleri Tablo 17’ de verildi.

Tablo 17. Deney gruplarına ait doku örneklerinde CHOP ve GRP78 değerleri

Parametreler	Deney Grupları					
	K	K+Çözücü	K+0.22BGM	KD+Çözücü	KD+0.05BGM	KD+0.22BGM
CHOP*	2961.5±29.6	3016.7±40.8	2850.3±34.2 ^b	3429±45.5 ^{a,b,c}	3011.3±51.3 ^d	2996.3±51.8 ^d
GRP78**	22.3±0.2	24±0.3 ^a	22.1±0.4 ^b	29.1±0.4 ^{a,b,c}	24.9±0.4 ^{a,c,d}	23.1±0.5 ^{d,e}

Sonuçlar ortalama± SEM şeklinde verildi. [^a K grubuna göre anlamlı, ^b K+Çözücü grubuna göre anlamlı, ^c K+0.22BGM grubuna göre anlamlı, ^d KD+Çözücü grubuna göre anlamlı, ^e KD+0.05BGM grubuna anlamlı göre fark görüldü (p<0.05).]

*pg/mg protein olarak hesaplandı, ** ng/mg protein olarak hesaplandı.

Gruplara ait doku CHOP düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna ait değerlere göre K+Çözücü ($p=0.943$), K+0.22BGM ($p=0.43$), KD+0.05BGM ($p=0.963$) ve KD+0.22BGM ($p=0.985$) gruplarına ait değerler arasında fark görülmezken, KD+Çözücü ($p=0.0001$) grubuna ait değerlerin anlamlı yüksek olduğu bulundu. Kafeterya diyeti ile beslenen gruplarda yüksek ve düşük konsantrasyonda BGM takviyesi verilen farelerin doku CHOP düzeylerinin BGM almayan farelerin doku CHOP düzeylerinden daha düşük olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.0001$). Doku CHOP düzeyleri açısından KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM grupları arasında ise anlamlı bir farklılık izlenmedi ($p=1$).

Doku GRP78 düzeyleri değerlendirildiğinde, kontrol grubuna ait değerlere göre K+0.22BGM ($p=0.999$) ve KD+0.22BGM ($p=0.667$) gruplarına ait değerler arasında fark yokken, K+Çözücü ($p=0.004$), KD+Çözücü ($p=0.0001$) ve KD+0.05BGM gruplarına ait değerlerin ($p=0.001$) anlamlı yüksek olduğu bulundu. Kafeterya diyeti ile beslenip düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan gruplardaki doku GRP78 değerlerinin KD+Çözücü grubuna göre düşük olduğu ($p=0.0001$), ayrıca KD+0.22BGM grubuna ait değerlerin de KD+0.05BGM grubuna ait değerlerden daha düşük olduğu bulundu ($p=0.035$).

4.2.3. Serum ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri ve Düzeyleri

Serum ve doku örneklerinde oksidatif stres parametrelerine ait değerler Tablo 18’de verildi.

Tablo 18. Deney gruplarına ait serum ve doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri ve düzeyleri

Parametreler	Deney Grupları					
	K	K+Çözücü	K+0.22BGM	KD+Çözücü	KD+0.05BGM	KD+0.22BGM
Serum TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L)	15.9 $\pm$ 0.33	23.5 $\pm$ 0.31 ^a	16 $\pm$ 0.45 ^b	37.6 $\pm$ 0.34 ^{a,b,c}	25.5 $\pm$ 0.22 ^{a,b,c,d}	24.9 $\pm$ 0.12 ^{a,b,c,d}
Serum TAS (mmol troluks eşdeğeri/L)	1.0 $\pm$ 0.03	1.0 $\pm$ 0.03	1.1 $\pm$ 0.02	0.8 $\pm$ 0.03 ^{a,b,c}	1.0 $\pm$ 0.02 ^d	1.1 $\pm$ 0.02 ^d
Serum OSI	1.6 $\pm$ 0.05	2.3 $\pm$ 0.07 ^a	1.4 $\pm$ 0.05 ^b	4.7 $\pm$ 0.21 ^{a,b,c}	2.4 $\pm$ 0.06 ^{a,c,d}	2.3 $\pm$ 0.04 ^{a,b,c,d}
Serum MDA (nmol/L)	1.9 $\pm$ 0.07	2.0 $\pm$ 0.07	2.0 $\pm$ 0.04	2.9 $\pm$ 0.09 ^{a,b,c}	2.6 $\pm$ 0.09 ^{a,b,c,d}	2.5 $\pm$ 0.08 ^{a,b,c,d}
Doku TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri /g protein)	0.358 $\pm$ 0.013	0.486 $\pm$ 0.12 ^a	0.420 $\pm$ 0.015	0.691 $\pm$ 0.030 ^{a,b,c}	0.539 $\pm$ 0.032 ^{a,c,d}	0.500 $\pm$ 0.015 ^{a,d}
Doku TAS (mmol troluks eşdeğeri/g protein)	0.144 $\pm$ 0.002	0.120 $\pm$ 0.005 ^a	0.173 $\pm$ 0.004 ^{a,b}	0.113 $\pm$ 0.006 ^{a,c}	0.121 $\pm$ 0.003 ^{a,c}	0.143 $\pm$ 0.004 ^{b,c,d,e}
Doku OSI	0.248 $\pm$ 0.008	0.410 $\pm$ 0.018 ^a	0.245 $\pm$ 0.012 ^b	0.628 $\pm$ 0.049 ^{a,b,c}	0.444 $\pm$ 0.026 ^{a,c,d}	0.350 $\pm$ 0.010 ^{c,d}
Doku MDA (nmol/mg protein)	6.1 $\pm$ 0.17	8.9 $\pm$ 0.18 ^a	6.6 $\pm$ 0.06 ^b	10 $\pm$ 0.13 ^{a,b,c}	8.1 $\pm$ 0.19 ^{a,b,c,d}	8 $\pm$ 0.13 ^{a,b,c,d}
SOD1 (ng/mg protein)	11.2 $\pm$ 0.20	11.9 $\pm$ 0.33	11.5 $\pm$ 0.33	19.5 $\pm$ 0.26 ^{a,b,c}	15.1 $\pm$ 0.28 ^{a,b,c,d}	15 $\pm$ 0.27 ^{a,b,c,d}
GPx1 (IU/mg protein)	324.5 $\pm$ 1.8	359.1 $\pm$ 3.4 ^a	339 $\pm$ 2.3 ^{a,b}	410.4 $\pm$ 2.4 ^{a,b,c}	352.3 $\pm$ 2.6 ^{a,c,d}	343.6 $\pm$ 2.7 ^{a,b,d}

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM şeklinde verildi [^a K grubuna göre anlamlı, ^b K+Çözücü grubuna göre anlamlı, ^c K+0.22BGM grubuna göre anlamlı, ^d KD+Çözücü grubuna göre anlamlı, ^e KD+0.05BGM grubuna göre anlamlı fark görüldü (p<0.05).]

Kontrol grubu ile K+0.22BGM grubu arasında serum TOS düzeyleri açısından fark bulunmazken ($p=1$), K+Çözücü, KD+Çözücü, KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM gruplarında serum TOS düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti ($p=0.0001$). Kafeterya diyeti ile beslenen gruplar karşılaştırıldığında ise KD+Çözücü grubuna ait serum TOS düzeylerinin KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM gruplarına ait serum TOS düzeylerinden yüksek olduğu ve bu yüksekliğin de istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.0001$). Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan kafeterya grupları arasında ise serum TOS düzeyleri açısından fark olmadığı görüldü ($p=0.775$).

Kontrol grubuna göre serum TAS düzeyleri karşılaştırıldığında K+Çözücü ($p=0.998$), K+0.22BGM ($p=0.079$), KD+0.05BGM ($p=0.99$) ve KD+0.22BGM ($p=0.282$) grupları arasında fark yokken, KD+Çözücü ($p=0.0001$) grubunda serum TAS düzeylerinin düşük olduğu görüldü. Kafeterya diyeti ile beslenen gruplarda yüksek ve düşük konsantrasyonlarda BGM takviyesi verilen farelerin serum TAS düzeylerinin, KD+Çözücü grubundaki farelerin serum TAS düzeylerinden daha yüksek olduğu belirlendi ($p=0.0001$). Bergamottin takviyesi uygulanan KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.638$).

Serum OSİ değerleri kontrol grubuna göre K+0.22BGM grubunda farklı değilken ($p=0.905$), K+Çözücü ($p=0.0001$), KD+Çözücü ($p=0.0001$), KD+0.05BGM ($p=0.0001$) ve KD+0.22BGM ($p=0.0001$) gruplarında anlamlı yüksek bulundu. KD ile beslenen gruplarda 0.05 ve 0.22 mg/kg konsantrasyonda BGM takviyesi verilen grupların serum OSİ seviyelerinin KD+Çözücü grubu serum OSİ seviyelerinden daha düşük olduğu belirlendi ($p=0.0001$). Serum OSİ değerleri açısından KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM grupları arasında ise fark görülmedi ($p=0.77$).

Serum MDA konsantrasyonları incelendiğinde kontrol grubuna ait MDA düzeylerine göre K+Çözücü ($p=0.887$) ve K+0.22BGM ($p=1$) gruplarında anlamlı bir fark görülmezken, KD+Çözücü ($p=0.0001$), KD+0.05BGM ($p=0.0001$) ve KD+0.22BGM ($p=0.0001$) gruplarında MDA düzeylerinin anlamlı yüksek olduğu belirlendi. KD grupları karşılaştırıldığında ise KD+Çözücü grubuna ait serum MDA düzeylerinin KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM gruplarından yüksek olduğu bulundu (sırasıyla $p=0.033$, $p=0.007$). Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan kafeterya gruplarının serum MDA değerleri arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.991$).

Doku TOS düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre K+Çözücü ($p=0.001$), KD+Çözücü ($p=0.0001$), KD+0.05BGM ($p=0.0001$) ve KD+0.22BGM ($p=0.0001$) gruplarında anlamlı artış görülürken, K+0.22BGM grubunda fark görülmedi ($p=0.304$). KD ile beslenen gruplarda yüksek ve düşük konsantrasyonlarda BGM takviyesi verilen grupların doku TOS düzeylerinin KD+Çözücü grubu doku TOS düzeylerinden daha düşük olduğu bulundu ($p=0.0001$). Doku TOS düzeyleri açısından KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM grupları arasında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p=1$).

Doku TAS düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna ait değerlere göre K+Çözücü ($p=0.003$), KD+Çözücü ($p=0.0001$) ve KD+0.05BGM ($p=0.005$) gruplarına ait değerlerin anlamlı düzeyde düşük, K+0.22BGM ($p=0.0001$) grubuna ait değer yüksek ve KD+0.22BGM ($p=1$) grubuna ait değerde ise fark olmadığı görüldü. KD+Çözücü grubuna ait doku TAS düzeylerine göre KD+0.05BGM grubunda farklılık görülmezken ($p=0.667$), KD+0.22BGM grubuna ait değerlerin arttığı görüldü ($p=0.0001$). Ayrıca KD+0.22BGM grubuna ait değerlerin de KD+0.05BGM grubuna ait değerlerden daha yüksek olduğu belirlendi ($p=0.009$).

Doku OSİ değerlerinin kontrol grubuna göre K+Çözücü ($p=0.0001$), KD+Çözücü ($p=0.0001$) ve KD+0.05BGM ($p=0.0001$) gruplarında anlamlı yüksek olduğu, K+0.22BGM ve KD+0.22BGM ($p=0.058$) gruplarında ise bir fark olmadığı bulundu ($p=1$). Kafeterya diyeti ile beslenip düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi verilen gruplardaki doku OSİ değerleri KD+Çözücü grubuna göre anlamlı düşük bulundu (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.0001$). Doku OSİ düzeyleri açısından KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM grupları arasında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.104$).

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda K+Çözücü ($p=0.0001$), KD+Çözücü ($p=0.0001$), KD+0.05BGM ($p=0.0001$) ve KD+0.22BGM ($p=0.0001$) gruplarının karaciğer dokularındaki MDA seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu ancak K+0.22BGM grubunda ise fark olmadığı bulundu ($p=0.141$). KD+Çözücü grubuna göre KD+0.05BGM ($p=0.0001$) ve KD+0.22BGM ($p=0.0001$) gruplarındaki MDA düzeylerinin anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan kafeterya gruplarının doku MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=1$).

Doku SOD1 düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna ait değerlere göre K+Çözücü ($p=0.483$) ve K+0.22 BGM ($p=0.954$) gruplarına ait değerler arasında fark görülmezken, KD+Çözücü ($p=0.0001$), KD+0.05BGM ($p=0.0001$) ve KD+0.22BGM ($p=0.0001$) gruplarına ait değerlerin ise anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu. KD+Çözücü grubuna göre KD+0.05BGM ($p=0.001$) ve KD+0.22BGM ($p=0.0001$) gruplarında doku SOD1 düzeylerinin düşük olduğu tespit edildi. Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan kafeterya gruplarının doku SOD1 değerleri arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı ($p=1$).

Yapılan istatistiksel analizler sonucu, tüm grupların karaciğer dokularında GPx1 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti ($p<0.05$). Doku GPx1 düzeyleri KD+Çözücü grubuna kıyasla KD+0.05BGM ($p=0.0001$) ve KD+0.22BGM ($p=0.0001$) gruplarında anlamlı düşük bulundu. Doku GPx1 seviyeleri açısından KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM grupları arasında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.186$).

4.2.4. Doku İnflamasyon ile Anti-İnflamasyon Parametreleri ve Düzeyleri

Deney gruplarına ait karaciğer dokularında inflamasyon ile anti-inflamasyon parametreleri düzeyleri Tablo 19’da verildi.

Tablo 19. Deney gruplarına ait karaciğer dokularında inflamasyon ile anti-inflamasyon parametreleri düzeyleri

Parametreler	Deney Grupları					
	K	K+Çözücü	K+0.22BGM	KD+Çözücü	KD+0.05BGM	KD+0.22BGM
TNF-α (pg/mg protein)	2682.9 $\pm$ 47.5	2788.4 $\pm$ 44.2	2602.8 $\pm$ 14	3323.2 $\pm$ 63.9 ^{a,b,c}	2919.5 $\pm$ 36 ^{a,c,d}	2831.4 $\pm$ 69.7 ^{c,d}
IL-1β (pg/mg protein)	2963 $\pm$ 40.8	3004.3 $\pm$ 48.5	2974.8 $\pm$ 30.8	3842 $\pm$ 39.3 ^{a,b,c}	3078.5 $\pm$ 47.5 ^d	3022.2 $\pm$ 50.8 ^d
IL-4 (pg/mg protein)	2146.7 $\pm$ 37.4	2050.3 $\pm$ 30.2	2120.5 $\pm$ 35.8	2009.7 $\pm$ 28.3	2059 $\pm$ 39.5	2107.6 $\pm$ 21.7
IL-10 (pg/mg protein)	1530.3 $\pm$ 31.4	1531.1 $\pm$ 14.4	1587.5 $\pm$ 42.1	1367 $\pm$ 29.5 ^{a,b,c}	1467.1 $\pm$ 31.8	1510.5 $\pm$ 45.8 ^d

Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM şeklinde verildi. [^a K grubuna göre anlamlı, ^b K+Çözücü grubuna göre anlamlı, ^c K+0.22BGM grubuna göre anlamlı, ^d KD+Çözücü grubuna göre anlamlı fark görüldü (p<0.05).]

Doku TNF- α seviyeleri açısından kontrol grubuna ait değerlere göre K+Çözücü ($p=0.661$), K+0.22BGM ($p=0.859$) ve KD+0.22BGM ($p=0.294$) gruplarına ait değerler arasında fark yokken, KD+Çözücü ($p=0.0001$) ve KD+0.05BGM ($p=0.018$) gruplarına ait değerlerin yüksek oldukları görüldü. Kafeterya diyeti ile beslenip düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi verilen gruplardaki doku TNF- α değerleri KD+Çözücü grubuna göre anlamlı düşük bulundu (sırasıyla $p=0.001$, $p=0.0001$). Yüksek ve düşük konsantrasyonlarda BGM uygulanan kafeterya diyeti grupları kendi içinde karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.804$).

Doku IL-1 β düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre K+Çözücü ($p=0.984$), K+0.22BGM ($p=1$), KD+0.05BGM ($p=0.43$) ve KD+0.22BGM ($p=0.927$) gruplarında fark görülmezken, KD+Çözücü grubunda doku IL-1 β değerlerinin yüksek olduğu bulundu ($p=0.0001$). KD ile beslenen 0.05 ve 0.22 konsantrasyonlarında BGM takviyesi alan gruplardaki doku IL-1 β değerlerinin KD+Çözücü grubuna göre düşük olduğu görüldü (sırasıyla $p=0.0001$, $p=0.0001$). Doku IL-1 β değerleri açısından KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM grupları arasında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.924$).

Yapılan istatistiksel analizler sonucu, doku IL-4 seviyeleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

Doku IL-10 düzeyleri değerlendirildiğinde, kontrol grubuna ait değerlere göre K+Çözücü ($p=1$), K+0.22BGM ($p=0.839$), KD+0.05BGM ($p=0.776$) ve KD+0.22BGM ($p=0.998$) gruplarına ait değerler arasında fark yokken, KD+Çözücü ($p=0.018$) grubuna ait değerlerin anlamlı yüksek olduğu belirlendi. KD grupları irdelendiğinde yüksek konsantrasyonda BGM takviyesi alan grubun doku IL-10 değerlerinin KD+Çözücü grubuna göre arttığı ($p=0.05$), fakat düşük konsantrasyonda BGM alan grupta bir değişiklik olmadığı görüldü ($p=0.317$). Yüksek ve düşük konsantrasyonlarda BGM uygulanan kafeterya diyeti grupları kendi içinde karşılaştırıldığında ise doku IL-10 değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.944$).

4.2.5. Doku CHOP ve GRP78 Gen Ekspresyon Düzeyleri

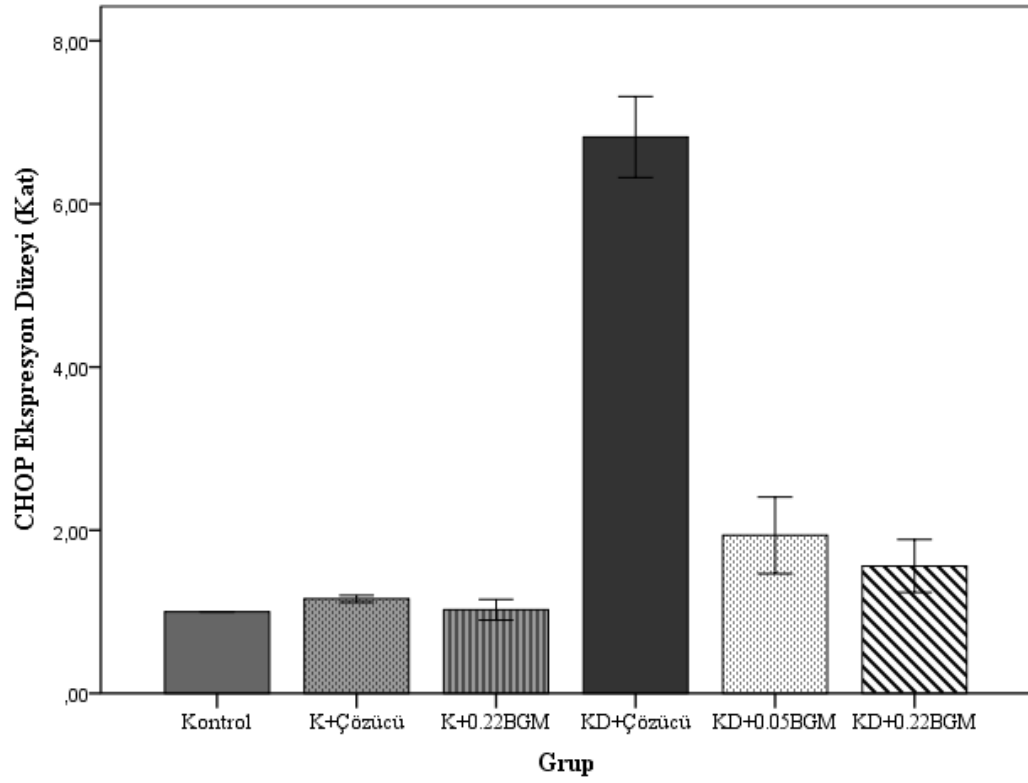
Grupların karaciğer dokularında ER stresi parametrelerinden CHOP ve GRP78 gen ekspresyonlarına ait sonuçlar Tablo 20’de verildi.

Tablo 20. Karaciğer dokularına ait CHOP ve GRP78 gen ekspresyonu sonuçları

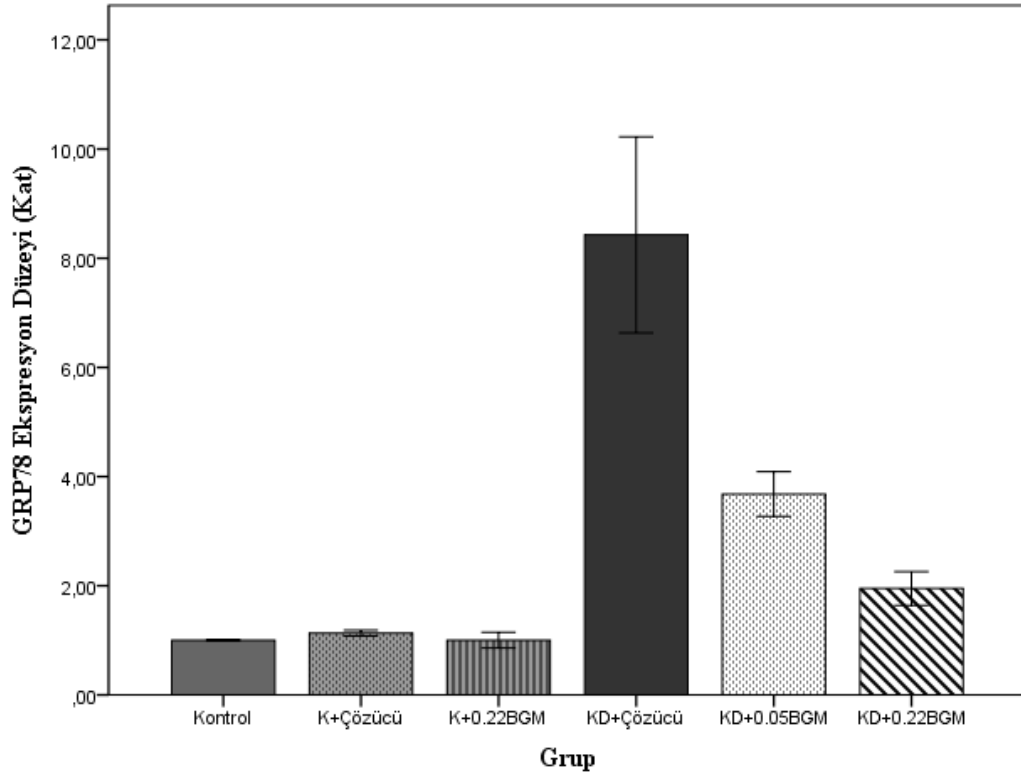
Parametreler	Deney Grupları					
	K	K+Çözücü	K+0.22BGM	KD+Çözücü	KD+0.05BGM	KD+0.22BGM
CHOP	1.0±0	1.39±0.06	1.06±0.02	6.72±0.14 ^{a,b,c}	1.79±0.11 ^{a,b,c}	1.55±0.09 ^{a,c}
GRP78	1.0±0	1.46±0.08	1.05±0.08	7.78±0.41 ^{a,b,c}	3.49±0.47 ^{a,b,c}	1.97±0.07

Sonuçlar ortalama± SEM şeklinde verildi. [^a K grubuna göre anlamlı, ^b K+Çözücü grubuna göre anlamlı, ^c K+0.22BGM grubuna göre anlamlı fark görüldü (p<0.05).]

Gruplara ait karaciğer dokularında CHOP gen ekspresyonu düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre KD+Çözücü grubunda ortalama 6.82 (p=0.0001), KD+0.05BGM grubunda ortalama 1.94 (p=0.0001) ve KD+0.22BGM grubunda ise ortalama 1.56 kat (p=0.007) artış gerçekleştiği ve bu artışların da istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunurken, K+0.22BGM grubu ile K grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (p=1). Karaciğer dokusu GRP78 gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde kontrol grubuna göre KD+Çözücü grubunda ortalama 7.75 kat (p=0.0001) ve KD+0.05BGM grubunda ortalama 3.48 kat (p=0.0001) artış olduğu görülürken, KD+0.22BGM grubunda 1.97 kat artış olmasına rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (p=0.223).



Şekil 18. Kontrol grubuna göre CHOP gen ekspresyon düzeyleri



Şekil 19. Kontrol grubuna göre GRP78 gen ekspresyonu düzeyleri

Kafeterya gruplarına ait CHOP ve GRP78 gen ekspresyonlarındaki kat değişimlerinin KD+Çözücü grubuna değerlendirilmesi Tablo 21’de verildi.

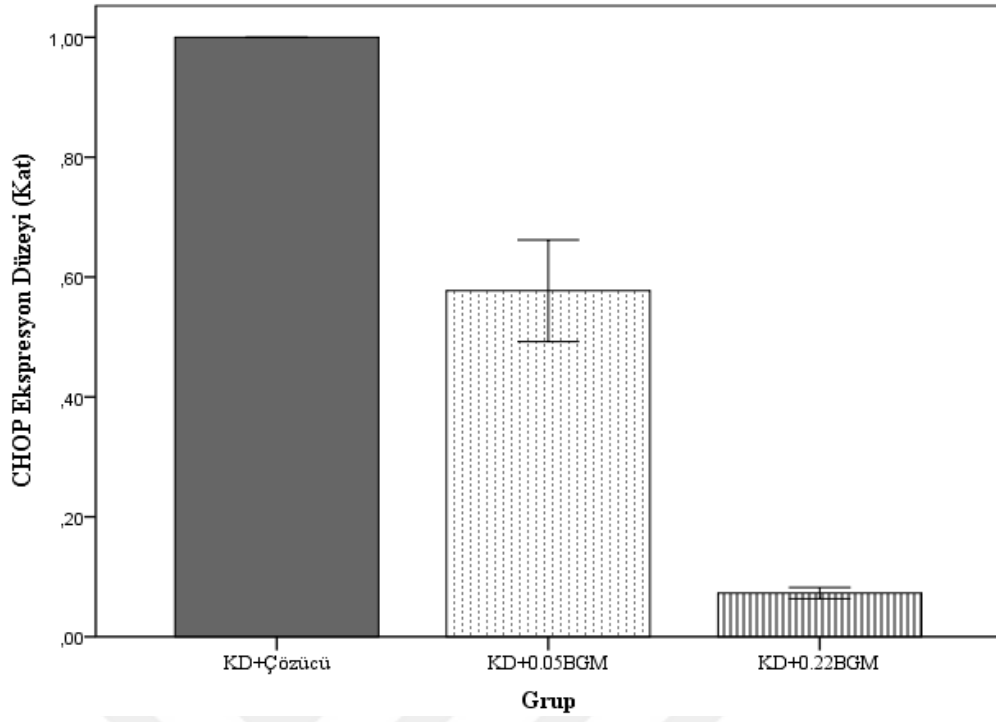
Tablo 21. Kafeterya gruplarında CHOP ve GRP78 gen ekspresyonlarındaki değişim

Parametre	KD+Çözücü	KD+0.05BGM	KD+0.22BGM
CHOP	1.0±0	0.577±0.120 ^a	0.073±0.013 ^{a,b}
GRP78	1.0±0	0.493±0.334 ^a	0.157±0.146 ^{a,b}

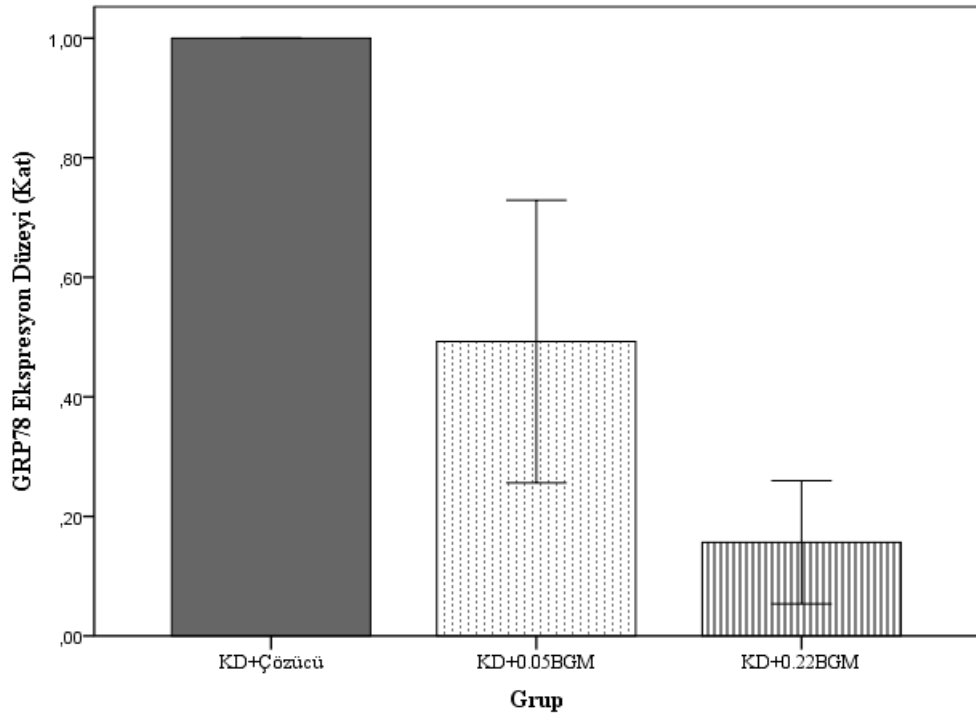
Sonuçlar ortalama± SEM şeklinde verildi [^a KD+Çözücü gurubuna göre anlamlı, ^b KD+0.05BGM gurubuna göre anlamlı fark görüldü (p<0.05).]

Kafeterya diyeti ile beslenip düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan gruplara ait dokularda CHOP ekspresyonunun KD+Çözücü grubuna kıyasla KD+0.05BGM (p=0.0001) ve KD+0.22BGM (p=0.0001) gruplarında azaldığı görüldü. Ayrıca KD+0.22BGM grubundaki azalmanın KD+0.05BGM grubundaki azalmadan istatistiksel olarak daha fazla olduğu bulundu (p=0.0001).

Kafeterya diyeti ile beslenerek yüksek ve düşük konsantrasyonda BGM takviyesi verilen gruplarda doku GRP78 ekspresyonlarının BGM verilmeyen KD+Çözücü grubuna göre daha düşük olduğu belirlendi (sırasıyla p=0.0001, p=0.0001). Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM alan gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında ise yüksek konsantrasyonda BGM alan gruba ait GRP78 gen ekspresyonu düzeyinin düşük konsantrasyonda BGM alan gruba göre daha çok azaldığı görüldü (p=0.012).



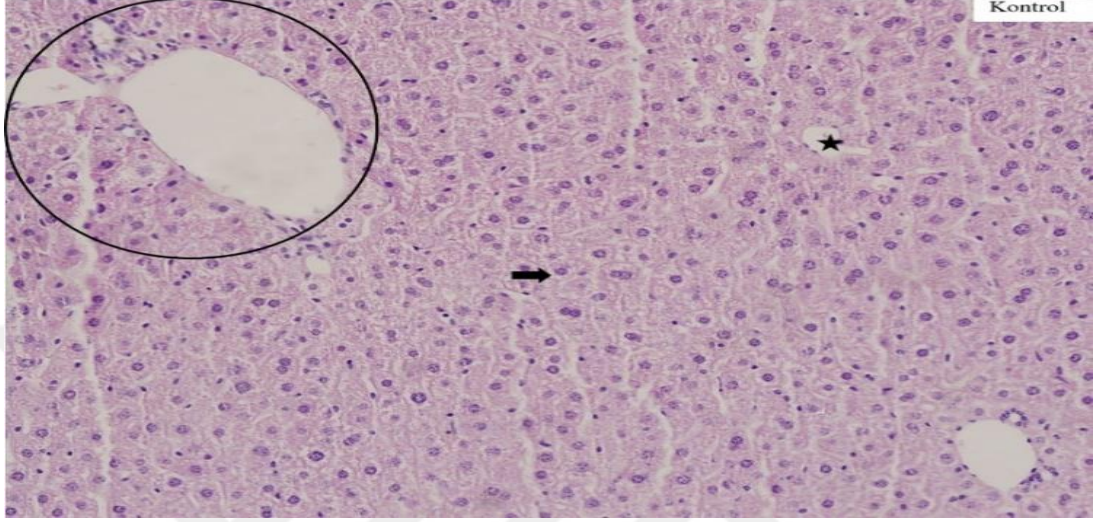
Şekil 20. KD+Çözücü grubuna göre kafeterya gruplarına ait CHOP gen ekspresyonu düzeyleri



Şekil 21. KD+Çözücü grubuna göre kafeterya gruplarına ait GRP78 gen ekspresyonu düzeyleri

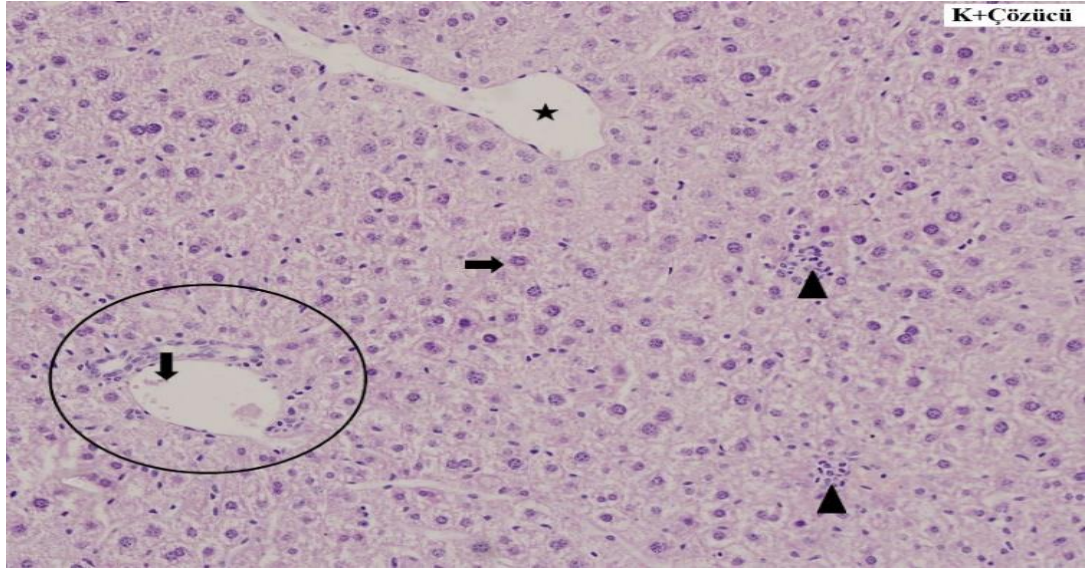
4.3. Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubunda normal karaciğer dokusu morfolojisi izlendi. Hepatositler, vena sentralis ve portal alanda bulunan yapılar normal görünümde izlendi (Resim 1).



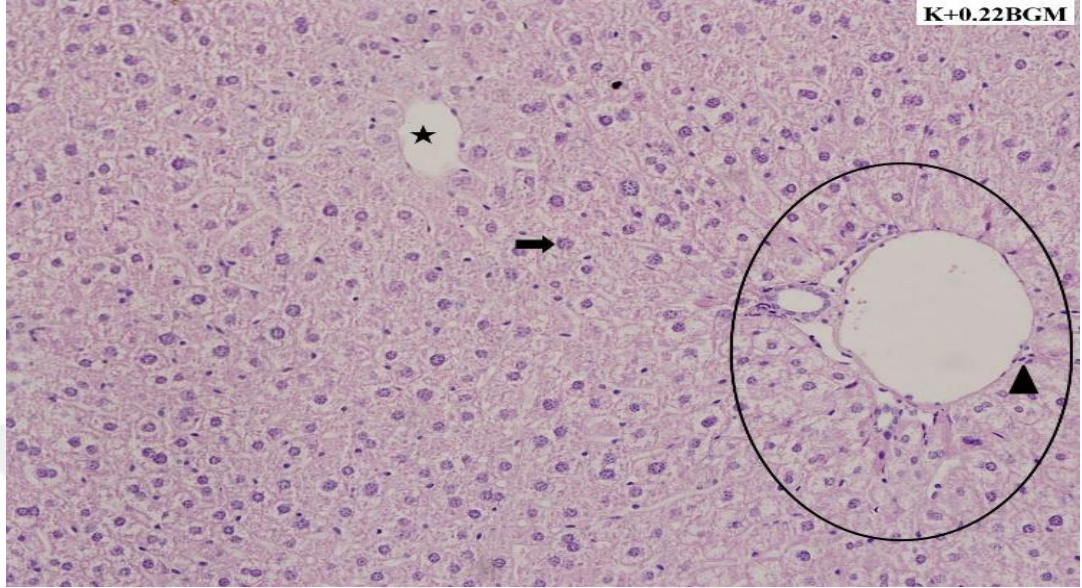
Resim 1. Normal morfolojide hepatositler (sağa bakan ok), portal alan (Elips) ve vena centralis (yıldız) (H&E X 200).

Kontrol+Çözücü grubuna ait karaciğer parankiminde yer yer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve hafif derecede vasküler konjesyon izlendi (Resim 2).



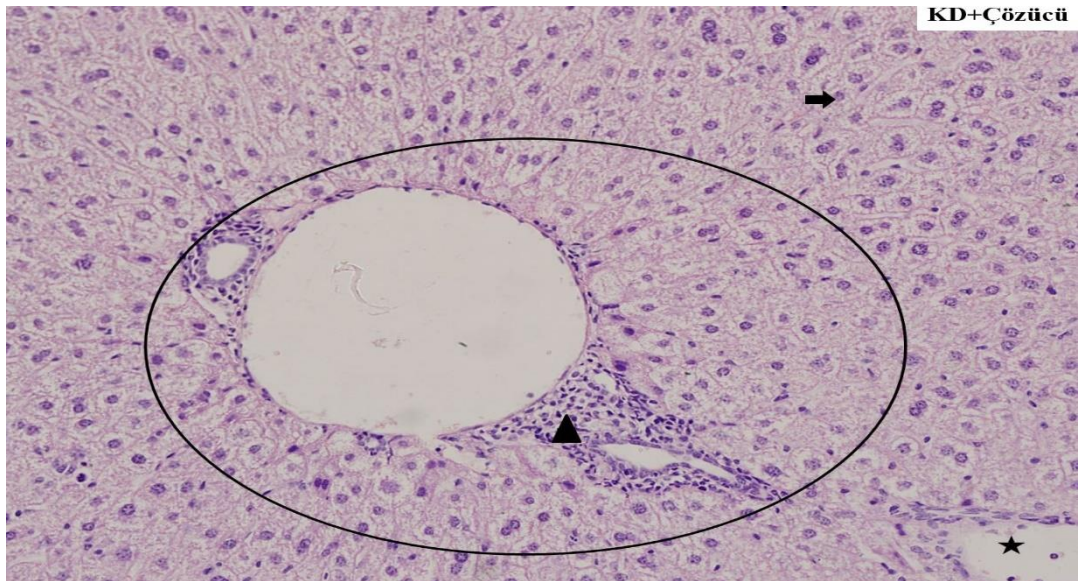
Resim 2. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu (Ok başı), vazokonjesyon (aşığıya bakan ok), normal morfolojide hepatositler (sağa bakan ok), portal alan (Elips) ve vena centralis (yıldız) (H&E X 200).

Kontrol+0.22BGM grubunda hafif dejeneratif hepatositler, normal morfolojide portal alan ve vena sentralis yapısı izlendi (Resim 3).



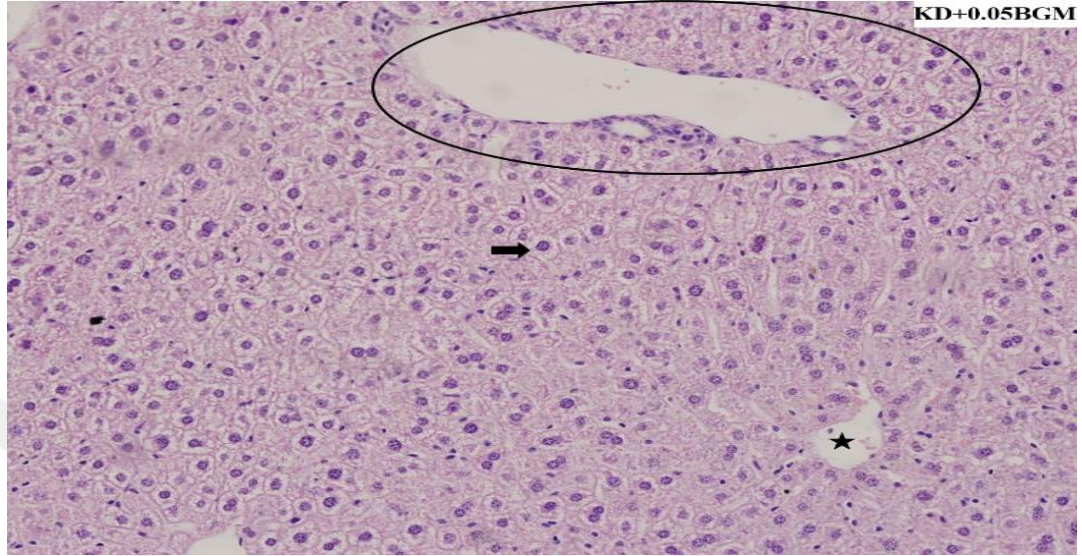
Resim 3. Hepatositler (sağa bakan ok), portal alan (Elips), vena centralis (yıldız) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (Ok başı) (H&E X 200).

KD+Çözücü grubu karaciğerinde yer yer dejeneratif hepatositler ve portal alanda yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlendi (Resim 4).



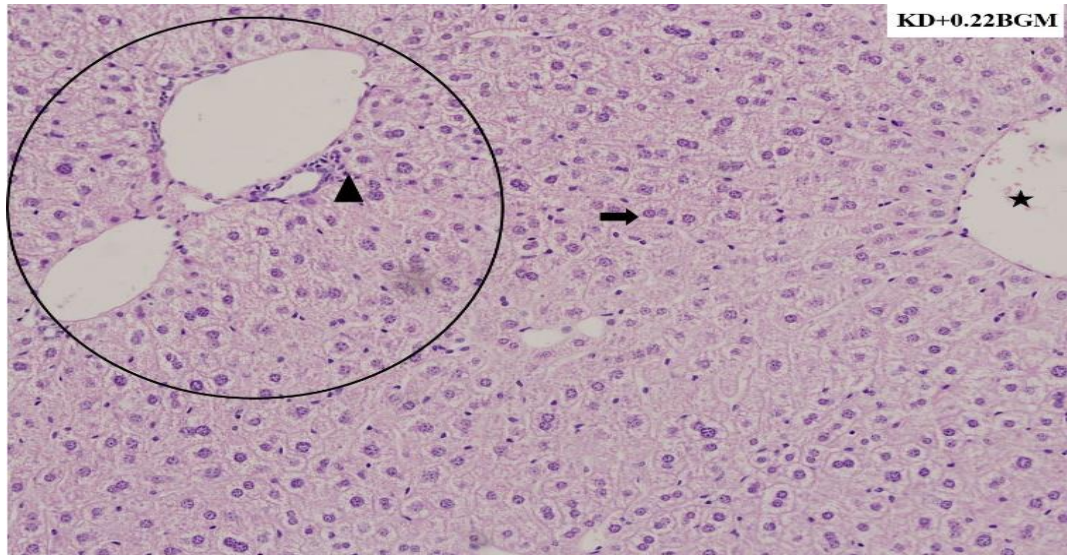
Resim 4. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu (Ok başı), dejeneratif hepatositler (ok), ve vena centralis (yıldız) (H&E X 400).

KD+0.05BGM grubuna ait karaciğerde hafif dejeneratif hepatositler, normal morfolojide portal alan ve vena sentralis yapısı izlendi (Resim 5).



Resim 5. Hepatositler (sağa bakan ok), portal alan (Elips) ve vena centralis (yıldız) (H&E X 200).

KD+0.22BGM grubuna ait karaciğerde hafif derecede vasküler konjesyon ve portal alanda hafif derecede inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlendi (Resim 6).



Resim 6. Hepatositler (sağa bakan ok), portal alan (Elips), vena centralis (yıldız) ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu (Ok başı) (H&E X 200).

Karaciğer dokusunda ait yarı-kantitatif skorlama sonuçları Tablo 22’de verilmiştir.

Tablo 22. Karaciğer Dokusu Yarı-Kantitatif Skorlama Sonuçları

Parametre	Deney Grupları					
	Kontrol	K+Çözücü	K+0.22BGM	KD+Çözücü	KD+0.05BGM	KD+0.22BGM
Hepatosit Dejenerasyonu	0.38±0.18	0.88±0.13	0.63±0.18	2.0±0.19 ^{a,b,c}	1.38±0.18 ^{a,c}	0.88±0.13 ^d
Vasküler	0.50±0.19	0.75±0.16	0.63±0.18	1.88±0.23 ^{a,b,c}	1.13±0.13	0.63±0.18 ^d
Konjesyon						
Sinüzoidal	0.38±0.18	0.75±0.16	0.88±0.12	1.25±0.16 ^a	1.25±0.16 ^a	1.25±0.16 ^a
Dilatasyon						
Sinüzoidlerde Vazokonjesyon	0.13±0.13	0.50±0.19	0.13±0.13	1.25±0.16 ^{a,b,c}	1.0±0.0 ^{a,c}	0.63±0.18 ^d
İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu	0.25±0.16	1.13±0.13 ^a	1.25±0.16 ^a	2.13±0.23 ^{a,b,c}	1.25±0.16 ^{a,d}	1.38±0.18 ^{a,d}

Sonuçlar ortalama±SEM şeklinde verildi (p<0.05). [^a K gurubuna göre anlamlı, ^b K+Çözücü gurubuna göre anlamlı, ^c K+0.22BGM gurubuna göre anlamlı, ^dKD+Çözücü gurubuna göre anlamlı fark görüldü (p<0.05).]

Hepatosit dejenerasyonu değerlerinin kontrol grubuna göre KD+Çözücü ($p=0.0001$) ve KD+0.05BGM ($p=0.002$) gruplarında anlamlı yüksek olduğu, K+Çözücü ($p=0.299$), K+0.22BGM ($p=0.895$) ve KD+0.22BGM ($p=0.299$) gruplarında ise bir fark olmadığı bulundu. KD grupları arasında yüksek konsantrasyonda BGM takviyesi alan grubun hepatosit dejenerasyonu değerinin KD+Çözücü grubuna göre anlamlı derecede azaldığı ($p=0.001$), fakat düşük konsantrasyonda BGM alan grupta bir değişiklik olmadığı görüldü ($p=0.109$). Hepatosit dejenerasyonu değeri açısından KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM grupları arasında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.299$).

Vasküler konjesyon skorları karşılaştırıldığında kontrol grubuna ait değere göre K+Çözücü ($p=0.923$), K+0.22BGM ($p=0.996$), KD+0.05BGM ($p=0.687$) ve KD+0.22 BGM ($p=0.996$) gruplarına ait değerler arasında fark yokken, KD+Çözücü grubuna ait değerlerin anlamlı yüksek olduğu bulundu ($p=0.003$). KD tüketen gruplar incelendiğinde yüksek konsantrasyonda BGM takviyesi alan grubun vasküler konjesyon değerlerinin KD+Çözücü grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı ($p=0.0001$), fakat düşük konsantrasyonda BGM alan grupta fark olmadığı görüldü ($p=0.057$). Yüksek ve düşük konsantrasyonlarda BGM uygulanan kafeterya diyeti gruplarına ait vasküler konjesyon değerleri arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.385$).

Sinüzoidal dilatasyon skoruna irdelendiğinde kontrol grubuna göre K+Çözücü ($p=0.576$) ve K+0.22BGM gruplarında ($p=0.263$) fark yokken, KD+Çözücü ($p=0.005$), KD+0.05BGM ($p=0.005$) ve KD+0.22BGM ($p=0.005$) gruplarında artış görüldü. Kafeterya diyeti ile beslenen gruplar kendi içlerinde karşılaştırıldığında sinüzoidal dilatasyon değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Aynı şekilde düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM uygulanan kafeterya grupları arasında da anlamlı bir fark izlenmedi ($p=1$).

Sinüzoidlerde vazokonjesyon skoru incelendiğinde kontrol grubuna ait değerlere göre K+Çözücü ($p=0.464$) ve K+0.22BGM ($p=1$) ve KD+0.22BGM ($p=0.170$) gruplarına ait değerler arasında anlamlı fark görülmezken, KD+Çözücü ($p=0.0001$) ve KD+0.05BGM ($p=0.002$) gruplarına ait değerlerin yüksek olduğu bulundu. KD tüketen gruplar arasında yüksek konsantrasyonda BGM takviyesi alan grubun sinüzoidal vazokenjesyon değerlerinin KD+Çözücü grubuna göre azaldığı ($p=0.044$), fakat düşük konsantrasyonda BGM alan grupta fark olmadığı görüldü ($p=0.828$). Sinüzoidal vazokenjesyon skoru açısından KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM grupları arasında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p=0.464$).

Karaciğer dokusunda tespit edilen inflamatuvar hücre infiltrasyonu skorunun kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda artış gösterdiği belirlendi ($p<0.05$). Kafeterya diyeti ile beslenip düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan gruplardaki inflamatuvar hücre infiltrasyonu değerlerinin KD+Çözücü grubuna göre düşük olduğu (sırasıyla $p=0.011$, $p=0.042$), ayrıca KD+0.22BGM grubuna ait değerlerin de KD+0.05BGM grubuna ait değerlerden daha düşük seyrettiği görüldü ($p=0.005$). Yüksek ve düşük konsantrasyonlarda BGM uygulanan kafeterya diyeti gruplarına ait inflamatuvar hücre infiltrasyonu skorları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.996$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Toplumda meydana gelen kültürel değişiklikler, ekonomik gelişmeler, gıda pazarının modernleşmesi ve gelişmesi, Western tarzı ucuz, lezzetli, yüksek kalorili gıdalara daha çok yönelim, abur cubur yiyecek tüketiminin yaygınlaşması ve fiziksel aktivitenin azalması gibi sağlıksız davranışlar birçok kronik hastalığın meydana gelmesinde rol oynayan faktörlerdir (157-159). Kronik aşırı yeme ile birlikte kalori açısından zengin bir Western diyet (WD), Batı yaşam tarzını yansıtmaktadır (fiziksel hareketsizlik, yetersiz uyku, artan kronik psikolojik stres, sigara içme ve çevre kirliliği). Sağlıksız besinlerden oluşan WD'nin yaygın tüketimi çeşitli sağlık sorunlarına yol açan en önemli faktörlerden biridir. WD'nin en çok etkilediği organların başında metabolik olarak aktif dokulardan birisi olan karaciğer gelmektedir (160). Karaciğer, endojen (lipid, karbohidrat, hormonlar vb.) ve ekzojen (ilaçlar) maddelerin sistemik metabolizmasında merkezi ve çok önemli bir rol oynar (19). Bu nedenle karaciğerin normal işleyişi, hayatta kalmak için önemli olduğu kadar hastalıkların başarılı tedavisi için de gereklidir (161).

Mevcut önleyici ve tedavi edici yöntemlere rağmen metabolik hastalıkların sıklığının ve mortalitesinin artmaya devam etmesi araştırmacıların bu hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesinde kullanılabilecek yeni ajan bulunmasına yönelik araştırmalara duydukları ilgiyi güncel tutmaktadır. Bu amaçla bilimsel çalışmalarda stratejik bilimsel yaklaşımlar arasında deneysel hayvan modelleri kullanımı sıklıkla tercih edilmektedir (162). Deney hayvanları kullanılarak yapılan çalışmalarda deneysel hastalık modelleri oluşturularak hastalıklar taklit edilmeye çalışılmaktadır. Bir hastalığın araştırılmasında deneysel model oluşturmanın birden fazla yolu vardır. Diyetle indüklenme modeli, invaziv olmaması nedeniyle hastalıkları modellemede daha çok tercih edilen bir yöntemdir (163). Literatüre bakıldığında karaciğer hasarı oluşturmak için diyet kullanımının yaygın olduğu görülmektedir. Örneğin, Asgharpour ve ark. yaptıkları çalışmada fazla yağlı ve karbohidratlı bir diyetle beslenen farelerde fibrozlu steatohepatit geliştiğini göstermişlerdir (164). Farrell ve ark. ise yaptıkları çalışmada karaciğer hasarı oluşturmak için yüksek yağlı ve/veya yüksek karbohidratlı diyet uygulanan farelerde karaciğer hasarı oluştuğunu göstermişlerdir (165).

Günümüzde diyet indüklü hastalık modeli oluşturmak için kafeterya diyetinin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Kafeterya diyeti yağ ve karbohidrat oranı yüksek, marketlerden satın alınabilen çeşitli besinler kullanılarak oluşturulur. Diyetle kullanılan besin bileşenleri lipid parametrelerinin seviyelerinin artmasına neden olur. Kötü beslenme

alışkanlıklarının devamlılığı biyokimyasal parametrelerde değişikliklere yol açarak kronik hastalık oluşumunu tetikleyebilir. Kafeterya diyeti gibi fazla kalorili ve sağlıksız yiyeceklerden oluşan diyetlerin tüketimi sonucunda gelişen ER stresi, oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtı bağlı olarak doku ve organların fonksiyonları bozulur. Ayrıca farklı türdeki farelerin ve sıçanların kafeterya diyeti ile beslenmelerinin sonucunda vücut ağırlıklarında artış ve diyabet geliştiği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kafeterya diyetinin en çok etkilediği organlar arasında glukoz ve lipid metabolizmasının ana merkezlerinden biri olan karaciğer gelmektedir. Kafeterya diyetinin içeriğinde bulunan fazla yağlı ve karbohidratlı besinlerin hepatik fibroz, inflamasyon, ER stresi ve lipoaptoz varlığıyla karaciğer hasarını şiddetlendirdiği gösterilmiştir (166, 167).

İnflamasyon sürecinin ER stresi ve hücresel işlevlerin bozulması ve artan oksidatif stres tarafından tetiklendiği bilinmektedir. Kafeterya diyeti gibi sağlıksız besinlerin fazla tüketimi, ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine ve UPR'ın indüklenmesine yol açarak ER stresini meydana getirir. Bunun sonucunda hücrelerde çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelir. Bu durum enerji metabolizmasının bozulmasına, oksidatif stres ve inflamasyona neden olan ROS'ların aşırı üretimine de neden olur (168). Ayrıca yüksek kalorili bir diyetin lipid peroksidasyonunu arttırarak da doğrudan oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir (169). Aşırı ROS üretimi ve antioksidan kapasitenin bozulmasıyla meydana gelen oksidatif stres, çeşitli inflamatuvar mediatörleri aktive ederek inflamasyon ve inflamasyonla ilişkili kronik hastalıkların gelişimine neden olur (170).

Dünyada sağlıksız yiyecek tüketmenin neden olduğu hastalıkların giderek yaygınlaşması, yeni önleyici ve tedavi edici ürünlerin geliştirilmesini ön plana çıkarmıştır. Karaciğer hastalıklarının tedavisinde de birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında cerrahi girişimler, ilaç kullanımı, egzersiz, sağlıklı diyet ile birlikte kalori kısıtlaması gibi yöntemler gelmektedir (171). Kötü beslenmenin neden olduğu kronik hastalıkların tedavisinde kalori kısıtlaması, uygun bir diyetle bağlı kalmak ve bunu uzun süre devam ettirmek gibi yöntemler hastaların büyük bir zorluk çekmesine neden olmakta ve hastalığın ortadan kaldırılmasında yetersiz kalmaktadırlar. Bu sebeple uygulaması kolay ve etkili alternatif kaynaklara ihtiyaç duyulmaktadır (172). Bu ihtiyaca cevaben hem yiyecek ya da içecek olarak tüketilen hem de tıbbi amaçlar için kullanılan şifalı bitkiler ve bitkisel doğal ürünlere duyulan ilginin giderek arttığı görülmektedir (123). Doğal ürünlerin anti-inflamatuvar, antioksidan, antidiyabetik, anti-obezite, hipolipidemik ve hepatoprotektif birçok özelliği bulunmaktadır. Doğal ürünler ve doğal ürünlerden elde edilen etken

maddelerin obezite, diyabet ve alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı gibi metabolik hastalıkların tedavisinde alternatif tedavi yöntemi olarak tercih edildikleri görülmektedir (125, 173). Antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-kanser özellikleri olduğu bilinen doğal ürünler arasında yer alan furanokumarinlerin hastalıkların önleminde ve tedavisinde sıkça tercih edildikleri görülmektedir (174, 175).

Furanokumarin ailesi üyelerinden birisi de BGM'dir. *İn vivo* ve *in vitro* çalışmalarda antikanser, anti-viral ve anti-inflamatuvar etkileri olduğu gösterilen BGM'nin metabolik hastalıklarda etkisinin incelendiği çalışmalar sınırlıdır (132, 176-179). Yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyet ile obezite modeli oluşturulan farelerde BGM'nin anti-obezite etkisine sahip olduğu, adiposit farklılaşması sırasında doğrudan AMPK aktivasyonu aracılığıyla adipogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (138). Bizde mevcut tez çalışmamızda kafeterya diyeti ile beslenen farelerde ER stresi, OS ve inflamasyon kaynaklı karaciğer hasarına karşı BGM'nin hasar iyileştirici etkisini inceledik.

Östradiol dişi farelerde yeme davranışı, gıda alımını ve vücut ağırlığı gibi özelliklerin standardize edilmesini zorlaştırır. Dişi hayvanların östrus siklusuna girmesiyle de besin tüketimlerinde bir azalma görülür ve bu durum dolaşımında mevcut olan östrojen seviyesi ile ilişkilendirilir (32, 180). Bu gibi sebeplerden ötürü yapılan çalışmalarda çoğunlukla erkek fareler tercih edilmektedir (6). Literatür taraması yapıldığında C57BL6/J ırkı farelerin diyetle indüklenen metabolik hastalıklara daha yatkın oldukları, hastalık modelini daha iyi yansıttıkları ve bu ırkta hastalık/hasar modelinin daha kolay tespit edilebildiği bilgisine ulaşılmaktadır (167, 181, 182). Tüm bu bilgiler tarafımızca değerlendirildikten sonra kolay elde edilebilen ve cerrahi araştırma merkezimiz tarafından üretimi de yapılan C57BL6/J ırkı erkek farelerin deneysel karaciğer hasarı modeli oluşturmak üzere kullanması tercih edildi. Literatüre bakıldığında KD uygulama süresinin 12-16 hafta arasında değiştiği görülmektedir (7, 183-185). Hayvalarda kilo alımı ve metabolik hastalık oluşturma sürecinin uzun olmasından dolayı bu sürelerin tercih edildiğini düşünmekteyiz. Literatürdeki örnekleri de inceleyerek çalışmamızda beslenme periyodunun 16 hafta olmasına karar verildi. İnsanlarda adolesan ve çocukluk döneminin farelerde 4-5. haftaya denk gelmesi, ayrıca farelerin farklı diyetle alışmaları ve 16 haftalık beslenme süreçleri de göz önüne alındığında deneye başlangıç yaşının 4-5. hafta olması uygun bulundu (182).

Farelerin bulunduğu odadaki kafes yerleşimi, farelerin sayısı, ağırlık ölçümü, enjeksiyon vs. gibi nedenlerle farelerin taşınması, kafeslerinin temizliği gibi dış etmenler

fareleri olumsuz etkileyebilecek faktörlerdir. Erkek fareler doğaları gereği dişi farelere göre daha agresif karakterde, oldukça hareketli (hiperaktivite) ve saldırgan yapıda oldukları için çalışmamızda farelerin ayrı barındırılmasına imkan veren özel olarak havalandırılan kafes sistemi (RAIR IsoSystem) kullanıldı. Farelerin bu kafeslerde tek olmaları sağlandı. Böylece tüm fareler için eşit ve standart barınma şartları sağlandı. Bu şekilde farelerin su ve yem tüketimindeki farklılık, saldırgan davranışlarda bulunarak birbirlerini yaralama ve hatta ölüme sebebiyet verme gibi sonuçlarımızı etkileyebilecek faktörlerin önüne geçilmesi amaçlandı.

In vivo ve *in vitro* çalışmalarda antikanser, anti-viral ve anti-inflamatuvar etkileri olduğu gösterilen BGM'nin kafeterya diyeti kaynaklı karaciğer hasarı üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Literatür incelendiğinde BGM'nin enjeksiyon, oral veya oral gavaj yoluyla uygulandığı görülmektedir (15, 139, 186). BGM'nin kullanıldığı deneysel hayvan modeli çalışmalarında 0.05 mg/kg ve 0.22 mg/kg konsantrasyonlarda uygulandığı görülmektedir (142, 143). Literatüre benzer şekilde bizde çalışmamızda BGM'nin hem düşük (0.05 mg/kg) hem de yüksek (0.22 mg/kg) dozlarını kullanmayı tercih ettik (142, 143). Bergamottin zayıf polar karaktere sahip olduğu için sulu çözeltilerde çözünürlüğü oldukça düşüktür. Bu nedenle BGM'nin DMSO içerisinde çözülmesi önerilmektedir (187, 188). Fakat DMSO'nun hayvanlarda artan karaciğer ağırlığına, steatoza, hücre nekrozuna ve hepatik toksisiteye neden olduğuna dair bilgilere ulaşılmaktadır. Bu nedenle araştırmacılara çözücü olarak kullanılan DMSO'nun son konsantrasyonunu toksik olmayan en düşük değerde kullanmaları önerilmektedir (189, 190). Suzuki ve ark. yaptıkları deneysel çalışmada BGM'yi %5'lik DMSO çözeltisinde çözerek kullandıklarını ve DMSO'nun bu konsantrasyonda toksik etkisi olmadığını bildirmişlerdir (15). Bizde çalışmamızda literatürle uyumlu ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda BGM'yi çözmek için %5'lik DMSO çözeltisi kullandık (5:100; DMSO: PBS) (15, 187).

Cerrahi araştırma merkezinden temin edilen C57BL6/J ırkı erkek farelere materyal metod kısmında belirttiğimiz şekilde 16 haftalık besleme programı uygulandı. Deney sürecinde başlangıç, ikinci, onikinci ve onaltıncı haftalarda farelerin ağırlıkları kaydedildi. 12.haftaya ulaşan hayvanların dört haftalık ip enjeksiyon süreçlerine başlandı. İntraperitoneal enjeksiyon intravenöz erişimin zor olduğu küçük türlerde ve büyük hacimlerde sıvıyı güvenli bir şekilde uygulamak için kullanılır (191). Bu nedenle enjeksiyonları ip olarak uygulamayı tercih ettik. Enjeksiyon uygulama süresi uzun olduğu

için enjeksiyonun yapıldığı alanda herhangi bir hasar oluşmaması, hayvanların ajite ve irite olmaması için BGM intraperitoneal alanda farklı bölgelere uygulandı.

Çalışmaya alınan fareler rastgele gruplara ayrıldı ve grupların başlangıç ortalama ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p<0.05$). Besleme periyodunun 12.haftasına gelindiğinde ise kafeterya diyeti ile beslenen gruplardaki kilo artışının kontrol gruplarına göre daha fazla olduğunu gördük (Tablo 15). Kafeterya diyeti kullanılarak yapılan çalışmalarda da KD'nin C57BL6/J ırkı farelerde kilo alımını başlattığı ve teşvik ettiği gösterilmiştir (192, 193). Valentin ve arkadaşları ratlarla yaptıkları 12 haftalık çalışma sonunda kafeterya diyetinin, standart diyete kıyasla vücut ağırlığında önemli bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (194). Çalışmamızda son haftaya gelindiğinde KD+Çözücü grubundaki kilo artışının diğer gruplardan fazla olduğunu, BGM takviyesi alan kafeterya gruplarında ise kilo alımının yavaşladığı hatta ortalama ağırlıklarının kontrol gruplarına yakın olduğunu tespit ettik (Tablo 15; $p<0.05$). Çalışmamızla uyumlu olarak Ko ve ark. 20 hafta süreyle yüksek yağlı diyet (HFD) ile besledikleri C57BL/6J erkek farelere HFD diyeti ile 50 mg/kg BGM verdiklerini, bu gruplara ait vücut ağırlığının sadece HFD ile beslenen gruplara ait vücut ağırlığından daha düşük olduğunu göstermişlerdir (138). Aynı çalışmada Ko ve ark. BGM'nin yağ dokusunda adiposit boyutunu ve lipid birikimini azalttığını göstermişler; vücut ağırlığındaki azalmanın bundan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca BGM'nin AMPK'nın fosforillenmesini önemli ölçüde arttırdığını da göstererek, HFD'nin neden olduğu vücut ağırlığı artışını önleyen mekanizmalardan birisinin de bu olabileceğini belirtmişlerdir (138). Bizde çalışmamızda bergamottinin kilo artışı üzerindeki inhibisyon etkisini bu yollar üzerinden gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz.

Karaciğer hasarını istatistiksel olarak göstermek için karaciğer indeksi formülü kullanılmaktadır. Çalışmamızda da literatürden yararlanılarak formül oluşturuldu ve karaciğer indeksi hesaplandı (149). Literatüre göre 5 ve 5'in üstünde karaciğer indeksine sahip olan farelerde karaciğer hasarı olduğu kabul edilmektedir (195). Yaptığımız çalışmada kafeterya diyeti ile beslenen gruplarda karaciğer indeksinin yüksek olduğunu gördük (Tablo 15). Literatüre bakıldığında Peng ve arkadaşları yaptıkları çalışmada obez ve fazla kilolu farelerin karaciğer indekslerinin diğer gruplardaki farelere göre yüksek olduğunu göstermişlerdir (196). Wang ve ark. ise HFD kullanarak yaptıkları obezite modeli çalışmasında, diğer gruplarla kıyaslandığında HFD grubunun karaciğer indeksinde kayda değer bir değişme görmediklerini belirtmişlerdir (197).

Yapılan çalışmalarda hastalıklara dair ipuçlarının ortaya konulması ve mevcut hastalığın tespit edilmesi için çok çeşitli metabolik parametreler ölçülmektedir. Bununla birlikte çalışmada kullanılan yöntem, deneysel model, uygulanan diyet içeriği gibi etmenler seçilecek olan parametreleri ve deneysel yöntemleri belirlemede önemlidir. Bizde çalışmamızda metabolik durumu daha iyi yansıtacağını düşündüğümüz ve karaciğer hasarının ortaya çıkarılmasını desteklemesi açısından serumda açlık glukoz, trigliserit, total kolesterol, ALT, AST ve insülin düzeylerini ölçtük.

Yüksek kaloriye sahip diyetlerin bozulmuş glukoz toleransını uyardığı bilinmektedir (192). Çalışmamızda serum açlık glukoz değerleri yönünden kontrol grubuyla karşılaştırıldığında KD+Çözücü grubu değerlerinin anlamlı arttığı gösterilmiştir (Tablo 16; $p<0.05$). Kafeterya diyetinin hiperglisemik bir etkisi bulunmaktadır. Deney hayvanlarına uygulanması glukoz metabolizmasının bozulmasına ve hipergliseminin tetiklenmesine neden olmaktadır (198). Çalışmamızla uyumlu olarak Sack ve arkadaşları C57BL/6N erkek farelere on hafta KD uyguladıklarını ve kontrol grubuna kıyasla KD verilen gruplarda serum glukoz seviyelerinin daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada KD gruplarına ait insülin seviyelerinin, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (199). Muntzel ve ark. ise yaptıkları araştırmada 15 gün boyunca sıçanlara kontrol diyeti ve KD verdiklerini, plazma glukoz seviyesinin KD tüketimi ile değişmediğini bildirmişlerdir (200). Sierra-Cruz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 75 gün boyunca KD ile besledikleri ratların serum glukoz düzeylerinin standart yemle beslenen ratlara göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (201). Literatürle uyumlu olarak elde ettiğimiz sonuçlar kafeterya diyeti tüketiminin kan glukoz değerleri üzerinde olumsuz etkilere yol açabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda kafeterya diyeti ile beslenen ve BGM takviyesi verilen grupların açlık serum glukoz düzeylerinde iyileşme olduğunu gördük (Tablo 16). Wang ve arkadaşları da streptozin (STZ) ile erkek Sprague-Dawley cinsi ratlarda diyabet oluşturduklarını, daha sonra furanokumarinlerden biri olan imperatorin takviyesinin yükselen plazma glukoz düzeylerini düşürdüğünü göstermişlerdir (202). Hipoglisemik potansiyeli olan doğal ürünlerin etkisini incelemek amacıyla bir *in vitro* model olan HepG2 hücrelerinde glukoz tüketim aktivitesine bakılmaktadır. Liu ve ark. yaptıkları çalışmada bergamottinin HepG2 hücrelerinde doza bağlı bir şekilde glukoz tüketimini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Bu çalışma bergamottinin potansiyel antidiyabetik etkisinin gösterildiği ilk çalışmalardan birisidir (128). Literatürle uyumlu olarak elde ettiğimiz

sonuçlar kafeterya diyetiyle beslenen farelerdeki yüksek glukoz seviyelerinin uygulanan BGM takviyesi ile azaltılabileceğini göstermektedir.

Diyet ile birlikte alınan fazla karbohidrat, karaciğerde aşırı miktarda TAG birikimine neden olur (203). Bu durum hepatik TAG ve kolesterol metabolizmasında bozukluklar ile sonuçlanır ve sonuçta çeşitli karaciğer hastalıkları meydana gelir (204). Çalışma gruplarımız serum trigliserit yönünden karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre kafeterya diyeti ile beslenen grupların serum TAG düzeyleri anlamlı yüksek bulundu (Tablo 16; $p<0.05$). Literatürde ise Li ve arkadaşları dişi C57BL/6JOlaHsd ırkı fareleri 14 hafta boyunca KD ile besleyerek obezite modeli oluşturduklarını, 14 hafta sonunda obez grupta plazma TAG düzeylerinin kontrol grubuna göre çok az yükseldiğini bildirmişlerdir (183). Aouichat ve ark. yaptıkları çalışmada 16 hafta boyunca KD ile beslenen Wistar ratlarda serum TAG düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (205). Thompson ve ark. ise yaptıkları çalışmada yetişkin erkek Wistar ratlara 35 gün süresince KD uyguladıklarını fakat kafeterya grubu ile kontrol grubu arasında TAG düzeyleri açısından fark bulamadıklarını bildirmişlerdir (206). Çalışmamızda KD ile beslenip yüksek ve düşük konsantrasyonda BGM takviyesi verilen farelerin serum trigliserit düzeylerinin BGM almayan farelerin trigliserit düzeylerinden daha düşük olduğunu gösterdik (Tablo 16). Rodríguez ve ark. STZ ile erkek Wistar ratlarda diyabet oluşturduktan sonra bu ratlara naringin (NAR) flavonoidi verdiklerini fakat NAR'ın bu sıçanların serum TAG'ındaki artışı önlemiş olmasına rağmen değerleri normalleştiremediğini belirtmişlerdir (207). Bunbupha ve ark. 16 hafta boyunca yüksek yağlı-yüksek fruktozlu diyet (HFFD) ile besledikleri erkek Sprague-Dawley cinsi ratlarda, HFFD grubu plazma TAG düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu; fakat yüksek ve düşük doz imperatorin takviyesi uyguladıkları gruplarda plazma TAG düzeylerinin düşüğünü göstermişlerdir (208).

Çalışmamızda total kolesterolün kafeterya diyeti verilen gruplarda diğer gruplara göre daha yüksek seyrettiğini gördük (Tablo 16). Total kolesterol düzeyinin yüksek olması diyet içeriğinde yer alan doymuş yağ asitleri, trans yağ asitleri ve kolesterol içerikli besinlerin tüketiminden kaynaklanmaktadır. Marco ve ark. yaptıkları çalışmada erkek Wistar ratlarını 14 hafta süreyle KD ile beslediklerini ve 14 hafta sonunda KD verilen grubun serum total kolesterol düzeylerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (209). Bonfim ve ark. yaptıkları çalışmada 16 hafta boyunca KD diyeti verilen Wistar ratlarda total kolesterol seviyelerinin kontrol grubuna ait T-K seviyelerinden daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (185). Liang ve ark. ise dişi C57BL/6 fareleri ile yaptıkları

çalışmada 12 hafta boyunca HFD ile beslemenin farelerde total kolesterol düzeyini artırdığını göstermişlerdir (3). Yine Souza ve ark. yaptıkları çalışmada HFD'nin C57BL/6 türü farelerde total kolesterol seviyesini artırdığını göstermişlerdir (210). Büyükdere ve ark. ise yaptıkları tez çalışmasında Wistar ırkı erkek ratları üç gruba ayırarak grupları KD, HFD ve kontrol yemiyle beslediklerini, 12 hafta sonunda KD ile beslenen gruba ait T-K düzeylerinin kontrol ve HFD gruplarına ait T-K düzeylerine kıyasla yüksek seyrettiğini bildirmişlerdir (211). Çalışmamızda KD+Çözücü grubuna göre yüksek konsantrasyonda BGM takviyesi alan grubun serum T-K düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı ($p=0.001$), fakat düşük konsantrasyonda BGM alan grupta bir değişiklik olmadığı görüldü ($p=0.188$; Tablo 16). Wang ve ark. yaptıkları çalışmada erkek C57BL/6 farelere BGM ile benzer yapıya sahip bir diğer furanokumarin olan naringenin uyguladıklarını fakat naringenin T-K düzeylerini üzerinde azaltıcı bir etki oluşturmadığını göstermişlerdir (212).

ALT ve AST, esas olarak karaciğer hücrelerinde lokalize olan amino gruplarının bir karbon iskeletinden diğerine aktarımını katalizleyen enzimlerdir. Hepatositler hasara uğradıklarında hücre zarının geçirgenliği artar ve karaciğer hücrelerindeki ALT ve AST kana salınarak serumdaki ALT ve AST düzeylerinin yükselmesine neden olurlar. Serum ALT ve AST seviyeleri karaciğer fonksiyonunun değerlendirilmesinde önemli ve hassas biyokimyasal parametrelerdir. Bu nedenle dolaşımdaki yüksek AST ve ALT düzeyleri de hepatoselüler bir hasarın göstergesi olabilir (213, 214). Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm kafeterya gruplarında serum ALT ve AST düzeylerinin yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 16; $p<0.05$). Ulla ve ark. hem yüksek karbohidrat hem yüksek yağlı diyet (HCHF) ile sekiz hafta besledikleri erkek Wistar ratlarına ait plazma ALT ve AST düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir (215). Mballa ve ark. 5 hafta KD'ye tabi tuttıkları erkek Wistar Albino ratların 5 hafta sonunda ALT ve AST düzeylerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (216). Faveri ve ark. yaptıkları çalışmada erkek C57BL/6 farelere 16 hafta süreyle KD uyguladıklarını fakat KD grubu serum ALT ve AST düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark oluşmadığını bildirmişlerdir (181). Çalışmamızda KD+Çözücü grubuna kıyasla KD ile beslenen fakat yüksek ve düşük konsantrasyonlarda BGM takviyesi verilen gruplarda ALT ve AST düzeylerinin azaldığını bulduk (Tablo 17). Rodriguez ve arkadaşları da STZ ile diyabet oluşturdukları erkek Wistar ratlarda naringenin farklı dozlarını denediklerini, 40 mg/kg konsantrasyon ve üzerinde naringenin kullanımının ALT ve AST enzim aktivitelerindeki artışı önleyebildiğini bildirmişlerdir (207). Liu ve ark. yaptıkları çalışmada C57BL/6 farelere 10

mg/kg Bergamottin'i ip şekilde enjekte ettikten 3 saat sonra LPS uyguladıklarını ve 6 saat sonra fareleri kurban ederek serum ALT ile AST düzeylerine baktıklarını bildirmişlerdir. Liu ve ark. elde ettikleri sonuçlarda LPS'nin doku hasarına neden olduğunu, Bergamottin ön tedavisinin ise serum ALT ile AST'yi ve doku hasarını önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermişlerdir (179). Çalışma sonuçlarımız ile kafeterya diyetinin karaciğer hasarına neden olacak şekilde normal enzim fonksiyonunu bozduğunu doğruladık. BGM takviyesinin ise sistemik transaminazların aktivitesini ve karaciğer fonksiyon bozukluğunu iyileştirebileceğini gösterdik.

İnsülin hormonu glukoz metabolizmasının ana düzenleyicisi görevini üstlenir, karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar ve karaciğerde glukagon hormonu aktivitelerini azaltır (217). Gelişmiş ülkelerde artan endişelerden biri de aşırı ve sağlıksız beslenmeye bağlı olarak karaciğerde glukoz üretiminin baskılanması olarak bilinen hepatik insülin direncidir (218). İnsülin direnci sitokin ve adipokin üretimindeki değişikliklere yol açarak inflamasyona, DNA hasarıyla sonuçlanan oksidatif strese, hücrel büyüme ve proliferasyonda rol oynayan hücrel yolların uyarılmasına neden olan çeşitli metabolik ve moleküler etkilere sahiptir (219). Karaciğerde meydana gelen insülin direnci ise farklı patofizyolojik hastalıkların gelişmesinde önemli rol oynar (220). Karaciğer, TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinleri salgılayan immün hücreleri aktive ederek glukoneogenez ve glikojenolizi düzenleyerek insülin direnci ve hepatik glukoz üretiminde önemli bir rol oynar (221). Yaptığımız çalışmada gruplara ait serum insülin değerlerini mukayese ettiğimizde kontrol olarak aldığımız gruba göre KD+Çözücü grubu serum insülin değerlerini anlamlı yüksek bulduk (Tablo 16). Benzer şekilde Auvi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 17 hafta sonunda, kafeterya diyeti ile besledikleri dişi Wistar ratların plazma insülin seviyelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek seyrettiğini göstermişlerdir (222). Çalışmamızda KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM gruplarına ait insülin düzeylerinin KD+Çözücü grubuna ait insülin düzeylerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azaldığı bulundu (Tablo 16). Sonuçlarımızla uyumlu olarak Arrabal ve ark. yaptıkları çalışmada HFD ve STZ ile diyabet oluşturdıkları erkek Sprague-Dawley ratlarda diyabete bağlı yükselen plazma açlık insülin düzeylerinin doğal furanokumarinlerden biri olan psoralen uygulanan grupta azaldığını göstermişlerdir (223).

Açlık glukozu ve insülin seviyeleri kullanılarak hesapladığımız insülin direncinin tahmini bir göstergesi olan HOMA-IR skoru kontrol grubuna göre KD+Çözücü grubunda da

anlamli yüksek bulunmuştur (Tablo 16; $p=0.0001$). Büyükdere ve ark. da yaptıkları çalışmada Wistar ırkı erkek ratlarda 12 haftalık besleme periyodu sonunda KD ile beslenen gruba ait HOMA-IR skorlarının kontrol ve HFD grupları HOMA-IR skorlarına göre yüksek görüldüğünü bildirmişlerdir (224). Teixeira ve ark. dişi Wistar ratlarla yaptıkları çalışmada 12 hafta boyunca KD ile beslenen genç ratlarda HOMA-IR düzeyinin bu grubun kontrolü olan ve standart bir diyetle beslenen gruba ait HOMA-IR düzeyinden yüksek olduğunu göstermişlerdir (225). Çalışmamızda KD ile beslenip düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi uyguladığımız gruplardaki HOMA-IR skorlarının da KD+Çözücü grubundan daha düşük olduğu görüldü (Tablo 16; $p=0.0001$). Çalışmamızda HOMA-IR skorları, insülin ve glukoz düzeyleri göz önüne alındığında tüm bu parametrelerdeki artış KD+Çözücü grubunda insülin direncinin geliştiğini göstermektedir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgular ve sonuçlar göz önüne alındığında literatürde daha önce yapılan benzer çalışmalarla paralellik göstersede daha önce BGM'nin, kafeterya diyeti ile oluşturulan karaciğer hasarında glukoz, TAG, T-K, ALT, AST, insülin ve HOMA-IR düzeylerinin tümü üzerinde olası etki/etkilerinin incelendiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda BGM takviyesi ile açlık glukoz, serum insülinin ve insülin direnci göstergesi HOMA-IR seviyelerindeki düşüş, hiperinsülineminin büyük ölçüde hafifletildiğine işaret etmektedir. BGM'nin glukoz, insülin ve HOMA-IR gibi metabolik parametreler üzerindeki olumlu etkisinin AMPK aktivasyonunu gerçekleştirerek sağladığını, yine AMPK aktivasyonu yolu ile TAG miktarını ve vücut ağırlığını da azalttığını ancak yine de daha ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz (138).

Endoplazmik retikulum homeostazisinin merkezi düzenleyicilerinden birisi de GRP78'dir ve işlevi moleküler bir şaperon olarak çalışmaktır. Normal koşullar altında UPR transmembran stres sensörleri olan ATF-6, PERK ve IRE1'e bağlıdır (56). Endoplazmik retikulum glukoz eksikliği, kalsiyum depolarının tükenmesi veya yanlış katlanmış proteinlerin aşırı birikmesi nedeniyle strese girdiğinde GRP78 protein katlanmasına yardımcı olmak için bulunduğu transmembran sensöründen ayrılır (226). ER stresinin devam etmesi normal şartlar altında düşük seviyede bulunan CHOP ekspresyonun artmasına neden olur. Artan CHOP ekspresyonu da ER'den Ca^{2+} çıkışına yol açarak mitokondriyal geçirgenliğin bozulmasına ve sonuçta da apoptoza yol açar (227). Literatürde katlanmış protein cevabı sinyal yolları ve CHOP gibi transkripsiyon faktörlerinin up-regülasyonunun, ER stresinin neden olduğu karaciğer hasarında etkin rol oynadığı bilgisine ulaşılmaktadır (228). KD tüketimine bağlı olarak meydana gelen ER stresi ve ER stresi parametrelerinden

CHOP ve GRP78'in incelendiği çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Çalışmamızda ELISA metodu ile ölçülen CHOP ve GRP78 düzeylerinin kontrol grubuna göre KD+çözücü grubunda arttığı görüldü (Bkz. Tablo 18). Li yaptığı çalışmada Sprague Dawley ratlara 10 hafta boyunca HFD uyguladıktan sonra adipoz dokuda Western blot yöntemi ile ölçtüğü GRP78 düzeyinin HFD ile beslenen grupta kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir (229). Çalışmamızda kafeterya diyeti ile beslenen gruplar karşılaştırdık ve KD+Çözücü grubuna kıyasla düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi alan gruplarda GRP78 ve CHOP düzeylerinin azaldığını bulduk (Tablo 17). Shangguan ve ark. yaptıkları çalışmada dişi Sprague Dawley ratlarda bir flavanoid olan naringinin hem yüksek hem de düşük dozlarını uyguladıklarını, naringinin serum GRP78 ve CHOP ekspresyonunu inhibe ettiğini ve bunun yanı sıra mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak apoptoz oranını düşürdüğünü göstermişlerdir (230). Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu sonuçlar BGM'nin, mitokondriyal ve ER stres aracılı apoptotik yolları inhibe ederek KD'nin neden olduğu ER stresini inhibe ettiğini göstermektedir. Apoptoz, anjiyogenez ve inflamasyon nükleer transkripsiyon faktörü NF- κ B tarafından düzenlenmektedir. NF- κ B'nin aktivasyonunun ER stresinin bir sonucu olduğu bildirilmiştir. NF- κ B, TNF- α , IL-1, lipopolisakkarit ve DNA hasarı gibi hücre stresi ile ilişkili inflamatuvar sinyaller ile de aktive edilebilir (231). BGM'nin, NF- κ B ve NF- κ B tarafından düzenlenen gen ürünlerinin baskılanmasına aracılık edebileceği gösterilmiştir (232). BGM ER stresi üzerindeki azaltıcı etkisini bu yolak üzerinden gerçekleştirmiş olabilir.

Oksidatif stres, apoptozun indüklenmesi ve karaciğer hasarının ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Oksidatif stres biyobelirteçleri arasından nitrik oksit, lipid hasar ürünleri (lipid peroksitler, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler/MDA), 4-HNE, DNA oksidasyon ürünleri [CYP2E1 ve 8-hidroksideoksiguanozin (8-OH-dG)] ve protein oksidasyon ürünlerinin (nitrotirozin, protein karbonil) düzeyleri ölçülmektedir. Serum veya plazma içerisinde bulunan farklı oksidanların konsantrasyonlarını laboratuvarlarda tek tek ölçebilmek mümkündür. Ancak bu ölçümleri yapmak hem maliyet hem de zaman açısından yetersiz kalmakta ve yapılmaları için de teknik bilgi gerekmektedir. Farklı oksidan konsantrasyonlarını tek tek ölçmek pratik olmadığı için toplam oksidan kapasite (toplam oksidan durum, reaktif oksijen metabolitleri) ölçülür (233). Aynı şekilde serum veya plazma içerisinde bulunan farklı antioksidanların konsantrasyonlarını da laboratuvarlarda tek tek ölçebilmek mümkün olsada pratik değildir. Bu nedenle numuneye ait tek bir antioksidan değil, toplam antioksidan kapasite ölçülür. Bu toplam antioksidan kapasitesi (TAC), toplam

antioksidan aktivitesi (TAA), toplam antioksidan gücü (TAOP), toplam antioksidan durumu (TAS) olarak da adlandırılabilir (234). Oksidatif stres indeksi (OSI) ise oksidatif stresi ölçmek için kullanılan; toplam oksidan durum ile toplam antioksidan durumun yüzde oranı olarak hesaplanan doğru ve kapsamlı bir parametre olarak görülmektedir (145, 235, 236). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlarla serum ile doku TOS ve OSI düzeylerinin kontrol grubuna göre kafeterya diyeti verilen tüm gruplarda arttığını tespit ettik. Serum TAS düzeylerinin kontrol grubuna göre KD+Çözücü grubunda azaldığını doku TAS düzeylerinin ise hem KD+Çözücü ($p=0.0001$) hem de KD+0.05BGM gruplarında ($p=0.005$) azaldığını gösterdik (Tablo 18). Küçük ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 16 hafta boyunca HFD ile besledikleri Sprague Dawley ratlarda karaciğer TOS ve OSI düzeylerinin kontrol diyeti ile beslenen gruba göre arttığını bulmuşlardır (237). Çalışmamızda KD ile beslenen gruplara yüksek konsantrasyonda BGM uygulandığında serum ile dokuda TOS ve OSI düzeylerinin azaldığını, TAS düzeylerinin ise arttığını gördük. Doku TAS seviyelerinin BGM verilen gruplarda daha yüksek olması, TOS'un aşırı üretimine karşı gelişen bir yanıtta kaynaklanıyor olabilir. Düşük konsantrasyonda BGM takviyesinin ise serum ve dokuda TOS düzeylerini azalttığını, fakat serumda TAS düzeyini artırırken dokuda anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını tespit ettik. Küçük ve arkadaşları yaptıkları çalışmada HFD ile beslenen Sprague Dawley ratlara doğal ürünlerden kurkumin ve kapsaisin verilmesinin doku TOS düzeylerini azalttığını göstermişlerdir (237).

Malondialdehit aldehit formunda olan ve elektrofilik yapısı nedeniyle reaktif bir moleküldür. Çeşitli çalışmalarda da oksidatif stresin biyobelirteci olarak kullanılır (238). İnsanlarda tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) yöntemi kullanılarak da yapılan çok sayıda çalışma ile kontrol gruplarına kıyasla karaciğer hastalıklarına sahip kişilerde artan MDA ve okside LDL (OxLDL) seviyeleri görülmüştür. Yine aynı şekilde deneysel sıçan ve fare kullanılarak oluşturulan farklı karaciğer hastalığı modellerinde karaciğer dokularında yüksek MDA varlığı gözlemlenmiştir (239). Çalışmamız sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kafeterya diyeti verilen tüm gruplarda serum ve doku MDA konsantrasyonlarının arttığı görüldü (Tablo 18). Bu durum KD ile beslenen farelerde oksidatif stres nedeniyle lipid peroksidasyonunun arttığına işaret etmektedir. Çalışmamızla uyumlu olarak Guedine ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada KD diyeti uyguladıkları Wistar erkek rat yavrularında MDA düzeylerini yüksek bulduklarını bildirmişlerdir (240). Çetin ve ark. da yaptıkları çalışmada KD'nin dişi Wistar ratlarda serum MDA seviyesini arttırdığını göstermişlerdir (241). Phuwapraisirisan ve ark. furanokumarinlerin, geranil yan

zincirlerindeki hidroksil grupları aracılığıyla lipid peroksidasyonu sonucu üretilen MDA ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu bir etki gösterdiklerini bildirmişlerdir (242). Çalışmamızda da KD ile beslenen gruplar arasında bir furanokumarin olan BGM'nin her iki konsantrasyonunda serum ve dokuda MDA düzeylerini azalttığını tespit ettik (Tablo 18). BGM'nin MDA düzeylerini azaltarak ve toplam antioksidan kapasiteyi artırarak hidrojen peroksitin olumsuz etkilerini önlemede rol oynayabileceğini gösterdik.

Reaktif oksijen türleri, mitokondri, peroksizomlar, sitokrom P-450, siklooksijenaz ve lipoksijenaz gibi çeşitli yollarla karaciğerde üretilir. Oksidatif stres, hücre zarında bulunan proteinlere ve lipidlere zarar verebilir. Çalışmamızda KD ile beslenen farelerin serum ve karaciğerinde TOS, OSI ve MDA seviyelerinin yükseldiği görüldü. Bu durum KD ile beslenen farelerde oksidatif stres oluştuğuna ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeylerinin hem serumda hem de dokuda artmış olması lipid peroksidasyonun varlığına işaret etmektedir. Kafeterya diyetinin zararlı etkisi, hepatik MDA'daki yükselme ve oksidatif strese neden olmakta, bu da aminotransferazların membran geçirgenliğini ve aktivitelerini artırarak karaciğer hasarına sebebiyet vermektedir. Literatürde KD'nin neden olduğu karaciğer hasarında Bergamottin takviyesinin serum ve karaciğerde ölçtüğümüz oksidatif stres parametrelerine olan etkisinin ölçüldüğü bir çalışmaya ise rastlamadık.

Fazla üretilen ROS'lar nedeniyle meydana gelen oksidatif stres antioksidan sistemler tarafından azaltılır veya ortadan kaldırılır. SOD süperoksidin O_2 ve H_2O_2 'ye dönüşmesini katalize eden antioksidan enzimdir (243). SOD1 tüm dokularda en fazla bulunan SOD izoformudur. Bu nedenle SOD1'in oksidatif stres üzerinde güçlü bir etkisi olacağını ve çalışmamızın kronik bir durumu araştırması açısından süresinin de uzun olduğunu hesaba katarak SOD1 ölçümünde aktivite miktarı yerine protein ölçümü yapmayı tercih ettik (244). Çalışmamızda kontrol grubuna göre kafeterya diyeti ile beslenen tüm gruplarda doku SOD1 düzeylerinin arttığını gösterdik (Tablo 18). Bouanane ve ark. yaptıkları çalışmada KD ile beslenen hem erkek hem de dişi Wistar ratların, kontrollerine kıyasla önemli ölçüde daha yüksek SOD aktivitelerine sahip olduklarını bildirmişlerdir (245). Bouanane ve ark. bu durumu antioksidan enzimlerin, yüksek oksidatif koşullarda tüketilebileceğine veya inaktive edilebileceğine; bununla birlikte, ROS'ların bazen antioksidan sistemlerin süpürebileceğinden daha yüksek miktarlarda üretilebileceğine bağlamışlardır. Mewes ve ark. hem dişi hem erkek Swiss farelerde KD diyeti uyguladıklarını, karaciğer SOD

aktivitesinin KD ile beslenen erkek farelerde KD ile beslenen dişi farelerden ve ayrıca hem dişi hemde erkek kontrol gruplarından daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (246). Ulla ve arkadaşları ise HFHC ile beslenen ratlarda karaciğer SOD düzeylerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (215). Molina ve ark. ise 8 hafta süreyle KD ile besledikleri erkek Wistar ratlarda SOD1 seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğunu bildirmişlerdir (247). Çalışmamızda KD+Çözücü grubuna göre KD+0.05BGM ve KD+0.22BGM gruplarında doku SOD1 düzeylerinin düşük olduğu tespit edildi (Tablo 18). Lin ve arkadaşları ise kolon kanseri oluşturmak için yaptıkları çalışmada C57BL/6J farelerde artan SOD düzeylerinin kuarsetin kullanımı ile azaldığını göstermişlerdir (248).

Sitoplazmada ve mitokondride yaygın olarak bulunan GPX1, hidrojen peroksiti katalizleyerek suya indirgeyen, GPX ailesinin en önemli üyelerinden birisidir (249). Çalışmamızda tüm grupların karaciğer dokularında GPX1 düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksekti (Tablo 19). Murao ve ark. yaptıkları çalışmada 12 hafta boyunca HFD ile besledikleri farelerde karaciğer GPX1 düzeyinin kontrol grubu GPX1 düzeylerinden daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (250). Jarukamjorn ve arkadaşları iki, dört ve sekiz hafta süreyle HFHF besledikleri erkek farelerin karaciğerinde ikici haftada GPX'in mRNA ekspresyon seviyelerinin yükseldiğini, dört ve sekizinci haftalarda enzim ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir (251). Dani ve ark. HFD kullanarak yaptıkları çalışmada HFD ile beslenen dişi ratlara ait GPX1 mRNA ekspresyon düzeylerinin kontrol diyeti ile beslenen ratlardan daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (252). Wali ve ark. doksorubisin (DOX) ile karaciğer hasarı oluşturdukları erkek Wistar ratlarda DOX'un GPX düzeyini azalttığını fakat oral olarak uyguladıkları naringenin azalan GPX düzeylerini arttırdığını ifade etmişlerdir (253). Biz ise yaptığımız çalışmada doku GPX1 düzeylerinin KD+Çözücü grubuna kıyasla BGM verilen KD gruplarında anlamlı düşük olduğunu bulduk (Tablo 18). Fazla miktarda üretilen ROS genellikle antioksidan moleküllerin üretimini uyarır. Oksidatif strese bağlı olarak antioksidan enzimlerin üretimi ve aktivitesi de artar. Bu nedenle KD diyeti grubunda GPX1 seviyesinin artmış olduğunu düşünmekteyiz.

SOD enzimleri hücre içi süperoksit konsantrasyonunu düşük tutarken, GPX enzimi de SOD reaksiyonu ile üretilen hidrojen peroksidi uzaklaştırmakla görevlidir (254). Fazla miktarda üretilen ROS genel olarak antioksidan moleküllerin üretimini uyarır. Artan oksidatif strese bağlı olarak antioksidan enzimlerin üretimi ve aktivitesi de artar. Kafeterya

diyeti tüketen gruplarda uzun süre kötü diyetle maruz kalmanın karaciğerde oksidatif stresi haliyle de ROS düzeyini arttırdığını ve artan ROS düzeyi ile SOD1 ve GPX1 enzimlerinin de dokuda artmasına neden olmuş olabileceğini düşünmekteyiz (255). Elde ettiğimiz bulgular da karaciğer dokusunda SOD1 ve GPX1 düzeylerinin arttığını göstermektedir. Bergamottin sistemik kullanılabilirliğe sahiptir ve vücuda alındıktan sonra olarak bergaptole metabolize edilir (14, 133). Bir molekülün veya metabolitlerinin antioksidan aktivitesi, nükleer yapı ile ilgili olarak fonksiyonel grupların düzenlenmesine bağlıdır. Molekülün yapısındaki hidroksil gruplarının hem konfigürasyonu hem de toplam sayısı, antioksidan aktivitenin çeşitli mekanizmalarını önemli ölçüde etkiler (256). Lipid peroksidasyonu sırasında antioksidanların serbest radikal zincirinin oksidasyonunu durdurarak ve fenolik hidroksil gruplarından hidrojen bağışlayarak daha fazla lipidin oksidasyonunu engellediğine veya yaymadığına inanılmaktadır (257). BGM'nin de antioksidan etkinliğinin kimyasal yapısının bir fonksiyonu olduğunu ve molekül yapısı içerisinde serbest radikalleri temizleme özelliğini sağlayan hidroksil grubu barındıran bergaptole metabolize edilmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ayrıca sitokrom enzimleri, reaktif oksijen türlerini üretebilir ve lipid peroksidasyonuna neden olabilirler (258). Sitokrom inhibisyonu etkileri iyi bilinen bergamottinin bu yol üzerinden de MDA ve TOS artışını azaltmış olabileceğini düşünmekteyiz. Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde azalan ALT ve AST düzeyleri ile pro-oksidan-antioksidan dengenin normalleşmesi stres aracılı karaciğer hasarının azaldığına işaret etmektedir.

Çeşitli kronik hastalıkların seyri sırasında karaciğer dokusunda hipoksi ve oksidatif stres gibi nedenlerle endoplazmik retikulum stresi oluşur. Reaktif oksijen ile reaktif nitrojen türevleri ve lipid peroksidasyonu yan ürünleri, TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerin yükselmelerinden sorumludur. Oksidatif stresin ortaya çıkması ile birlikte, oksidan ve antioksidan savunma arasındaki dengesizlik, merkezi granüositlerin inflamatuvar infiltrasyonuna, IL-1 β ve TNF- α gibi çok sayıda pro-inflamatuvar faktörün üretimine yol açar (259). Reaktif oksijen türlerinin artışı, pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-6 ve IL-1) upregülasyonu, apoptoz ve hepatik fibroz gelişimi ile de kronik inflamatuvar yanıtı doğrudan veya dolaylı olarak katkıda bulunur (92).

Pro-inflamatuvar bir sitokin olan TNF- α , viral hepatit, alkollü karaciğer hastalığı, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ve iskemi-reperfüzyon hasarı gibi karaciğerde oluşan hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Esas görevi ise hepatosit

proliferasyonunun ve karaciğer rejenerasyonunun sağlanmasıdır (260). Artan TNF- α düzeylerinin karaciğer hastalıkları ve patolojileriyle ilişkili olduğu, karaciğerde meydana gelen hasar ilerledikçe dolaşımdaki seviyelerinin arttığı bildirilmektedir (261). Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla KD+Çözücü ve düşük doz BGM verilen gruplara ait doku TNF- α düzeyleri yüksek bulundu (Tablo 20). Cardoso ve ark. yaptıkları çalışmada dişi Wistar ratlara 14.5 ve 17 hafta KD uyguladıktan sonra bu grupların ileumlarında TNF- α düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir (262). Machado ve ark. erkek C57Bl/6 farelere 16 hafta süreyle KD uyguladıktan sonra diyetin TNF- α düzeylerini kontrol grubuna göre artırdığını göstermişlerdir (263). Çalışmamızda kafeterya diyeti ile beslenip düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi verilen gruplardaki doku TNF- α değerlerinin KD+Çözücü grubuna göre anlamlı düşük olduğunu bulduk (Bkz. Tablo 19). Literatürde de Rehman ve ark. yaptıkları çalışmada Wistar ratları HFD ile 30 gün beslediklerini ve doğal bir flavonoid olan hesperidinin HFD ile beslenen ratların serum ve beyaz yağ dokularında TNF- α düzeylerini düşürdüğünü bildirmişlerdir (264). Mahmoud ve ark. yaptıkları çalışmada beyaz erkek albino ratları HFD ile besledikten sonra serum TNF- α düzeylerine baktıklarını normal ratlara kıyasla diyabetik ratlarda TNF- α seviyesinin önemli ölçüde yükseldiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada hesperidin ve naringinin oral yolla verilmesi sonucu diyabetik ratlarda artan bu seviyelerin önemli ölçüde düzeldiğini bildirmişlerdir (265). An ve arkadaşları RAW264.7 hücrelerine bergamottin uyguladıklarını ve inflamasyonlu hücrelere göre bergamottin uygulanan hücrelerde TNF- α düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada C57/BL/6 farelerde LPS kaynaklı inflamasyon sırasında artan TNF- α düzeylerinin, BGM takviyesi ile azaldığını göstermişlerdir (139). An ve arkadaşları SIRT1'in indüklenmesi ve NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonu aracılığıyla BGM'nin, LPS kaynaklı makrofaj inflamatuvar yanıtını ve inflamasyonunu hafiflettiğini bildirmişlerdir. Sasaki ve ark. da yaptıkları *in vitro* çalışmada farklı dozlarda uygulanan BGM'nin TNF- α ile indüklenen endotelial molekül ekspresyonunu ve lökosit yapışmasını azalttığını bildirmişlerdir (266).

IL-1 β , hepatik steatoz ve insülin direnci dahil olmak üzere obeziteye bağlı patolojik durumlarda rol oynayan sistemik inflamatuvar bir sitokindir. Çalışmamızda kafeterya diyetinin karaciğer dokusunda IL-1 β düzeylerinde artışa yol açtığını gösterdik. (Tablo 19). Hansen ve ark. yaptıkları çalışmada KD ile besledikleri erkek Wistar ratların karaciğer dokularında IL-1 β düzeylerinin arttığını bulmuşlardır (267). Sagae ve ark. yaptıkları çalışmada KD ile beslenen dişi Wistar ratların plazma IL-1 β düzeylerinin kontrol grubuna

göre yüksek olduğunu bulmuşlardır (268). Çalışmamızda KD ile beslenen fakat düşük ve yüksek konsantrasyonlarda BGM takviyesi verilen gruplardaki doku IL-1 β değerlerinin KD+Çözücü grubuna göre düşük olduğu görüldü (Tablo 19). Meng ve ark. erkek Sprague Dawley ratlarda prostatit modeli oluşturduktan sonra bir flavonoid olan kuarsetin uyguladıklarını ve inflamasyon göstergesi olan yüksek IL-1 β düzeylerinin kuarsetin uygulamasıyla azaldığını bildirmişlerdir (269). Yang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada db/db farelerde karaciğer IL-1 β düzeylerinde önemli bir artış gözlemlendiğini fakat kuarsetin kullanımının bunu önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir (270). Liu ve ark. yaptıkları çalışmada erkek C67BL/6/J farelerde inflamasyon sırasında artan IL-1 β düzeylerinin BGM verilen grupta azaldığını göstermişlerdir (179).

Pro-inflamatuvar sitokinler, inflamatuvar sinyal yollarını uyararak; inflamatuvar yanıt oluşumunu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu başlatırlar. Sonuç olarak karaciğer hasarı gelişimine neden olurlar (271). Çalışmamızda kafeterya diyeti farelerin karaciğer dokularında pro-inflamatuvar sitokinleri arttırarak inflamasyona neden oldu. BGM'in KD'nin neden olduğu TNF- α ve IL-1 β 'yi inhibe ederek bir anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğunu gördük. BGM'nin, anti-inflamatuvar aktivite için ROS/NO oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (14). BGM oksidatif stresi azaltarak bir anti-inflamatuvar etki sağlamış olabilir. Ayrıca BGM'nin bir metaboliti olan bergaptolun antioksidan aktiviteyi ve hem oksijenaz-1 ekspresyonunu artırarak anti-inflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (14). Yaptığımız çalışmada da BGM'nin bergaptole metabolize olduktan sonra bergaptol aracılığıyla hem oksijenaz-1 ekspresyonunu artırarak anti-inflamatuvar etki sağlamış olabileceğini ancak yine de daha ayrıntılı araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

IL-4 pro-inflamatuvar ortamı baskılayarak etki gösteren anti-inflamatuvar sitokindir (272). IL-4, karaciğer rejenerasyonu esnasında; Th2 hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler veya karaciğerdeki eozinofiller olmak üzere immün hücre infiltrasyonu ile üretilir ve insülinin hepatositlerdeki etkisini arttırır. Yapılan birkaç çalışma IL-4'ün, kemirgenlerin karaciğerindeki etkisinin diyet manipölasyonlarından etkilenebileceğini göstermiştir (273). Çalışmamızda grupların IL-4 seviyeleri karşılaştırıldığında, bu altı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 19; p>0.05). Lin ve ark. ise yaptıkları çalışmada HFD ile beslenen obez farelerde IL-4 düzeylerinin lean (zayıf) gruba kıyasla daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (273).

IL-10 monositlerden ve makrofajlardan pro-inflamatuvar mediyatörlerin salınımı inhibe ederek TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerinin salgılanmasını da inhibe etmiş olur. Farelerde oluşturulan deneysel listeriozis modelinde IL-10'un TNF- α salgısını inhibe ettiği ve karaciğeri hasara karşı koruduğu bildirilmiştir (115). Çalışmamızda kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda KD+Çözücü grubu IL-10 düzeylerinin azalmış olduğunu bulduk (Tablo 19). Bortolin ve ark. yaptıkları çalışmada 18 hafta süreyle KD ile beslenen erkek Wistar ratların serum IL-10 düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha düşük olduğunu göstermişlerdir (163). Toledo ve ark. erkek Wistar ratlarla yaptıkları çalışmada karaciğer IL-10 seviyelerinin kafeterya diyeti verilen grupta çok düşük seviyelerde seyrettiğini göstermişlerdir (274). Çalışmamızda KD ile beslenen ve yüksek konsantrasyonda BGM uygulanan grupta IL-10 düzeylerinin arttığı fakat düşük konsantrasyonda BGM uygulanan KD grubunda IL-10 düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmadığını gördük (Tablo 19). BGM takviyesi doza bağlı bir eğilimde IL-10 seviyeleri üzerinde iyileştirici bir etki sergilemiştir. Dias ve ark. ise yaptıkları çalışmada 13 hafta süreyle KD ile besledikleri erkek Swiss farelerde IL-10 seviyelerini analiz ettiklerini ve KD +Distile Su grubuna ait IL-10 seviyelerinin bir flavonoid olan vitamin C uyguladıkları KD grubuna ait IL-10 seviyelerine göre azalmış olduğunu bildirmişlerdir (275).

mRNA ekspresyon analizlerinin gerçekleştirilmesinde birçok yöntem mevcuttur. Real-time PCR, Northern blot, makroarray ve mikroarray sık kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Bu yöntemlerden RT-PCR, uygulanmasının kolay olması, analiz maliyetlerinin düşük olması, çok sayıda gen ürününün kullanılabilmesi ve amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi gibi birçok avantaja sahiptir. Real-time PCR metoduyla birlikte, DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılabilmiş ve ölçülebilmiş, reaksiyonların başından beri meydana gelen ürün miktarı real-time PCR sırasında takip edilir hale gelmiştir (150). Çalışmamızda GRP78 ve CHOP gen ekspresyon seviyelerinin ölçümü için RT-PCR yöntemi kullanıldı. Real-time PCR öncesinde RNA izolasyonu yapılmaktadır. Endojen RNazlar, dokunun bütünlüğünün bozulması ile birlikte hücresel bölmelerden salınırlar. RNA'nın yıkılmasının önüne geçmek için RNazların mümkün olduğunca kısa sürede inaktive edilmesi önemlidir. Bu sebeple, kesim yapılan aynı günde RNA izolasyonu da yapıldı. Çalışılan alanın, kullanılan tüm malzemelerin ve kimyasalların steril olmasına dikkat edildi. Çalışma yapılacak alanlarda yabancı DNA veya RNA'ların barınmaması için sterilizasyon işlemi uygulandı. Ribonükleazlar RNA'ları parçalayan, tüm doku ve yüzeylerde bulunabilen çevresel faktörler karşısında dayanıklılık gösteren enzimlerdir. Bu

nedenle çalışmada kullanılacak tüm malzemelerin kullanılmadan önce steril olmasına özen gösterildi. Elde edilen total RNA'lar yine aynı gün içerisinde cDNA'ya çevrildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu sırasında çoğaltılan ürünlerin tespitinde, floresan teknolojisi kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan yöntemler, DNA'ya bağlanan boyalar ve hedefe özgü floresans işaretli problemlerdir (152, 276). Çalışmamızda SYBR Green boya kullanmayı tercih ettik. Ekspresyon deneylerinin sonuçlarını hesaplarken karşılaştırmalı 2^{-ΔΔCp} metodu ile göreceli kantifikasyon gerçekleştirildi. Bu yöntem, tüm numunelerde sabit kopye sayısına sahip bir housekeeping (referans) gen kullanımını şart koşar. Çalışmamızda β-Aktin housekeeping geni referans gen olarak kullandık (277).

Gruplara ait karaciğer dokularında CHOP ve GRP78 gen ekspresyonu düzeyleri değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre her iki gen ekspresyonu düzeyinin KD+Çözücü grubunda yüksek bulduk (Tablo 20). Li yaptığı çalışmada 10 hafta boyunca HFD ile beslenen Sprague Dawley ratların yağ dokularında ölçtüğü GRP78 ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bulmuştur (229). Ruan ve ark. yaptıkları çalışmada erkek Sprague Dawley ratları 16 hafta süreyle HFD ile beslediklerini, daha sonra karaciğer dokularında Western blot yöntemi ile ölçülen CHOP protein ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HFD grubunda önemli ölçüde yüksek olduğunu fakat; GRP78 protein ekspresyonunda anlamlı değişiklik görmediklerini bildirmişlerdir (278). Çalışmamızda KD ile beslenen gruplara yüksek ve düşük konsantrasyonlarda BGM takviyesi uyguladığımızda hem CHOP hem de GRP78 gen ekspresyonlarının azaldığını gördük (Tablo 21). ER işlevindeki değişikliklere yol açan ER stresi karaciğer hastalıkları dahil olmak üzere farklı patolojilerin meydana gelmesinde etkin rol oynamaktadır. Çalışmamızda BGM'nin ER stresi ile ilişkili olarak ekspresyonları artan CHOP ve GRP78 proteinlerinin karaciğer dokusundaki ekspresyonlarını gen düzeyinde azalttığını tespit ettik.

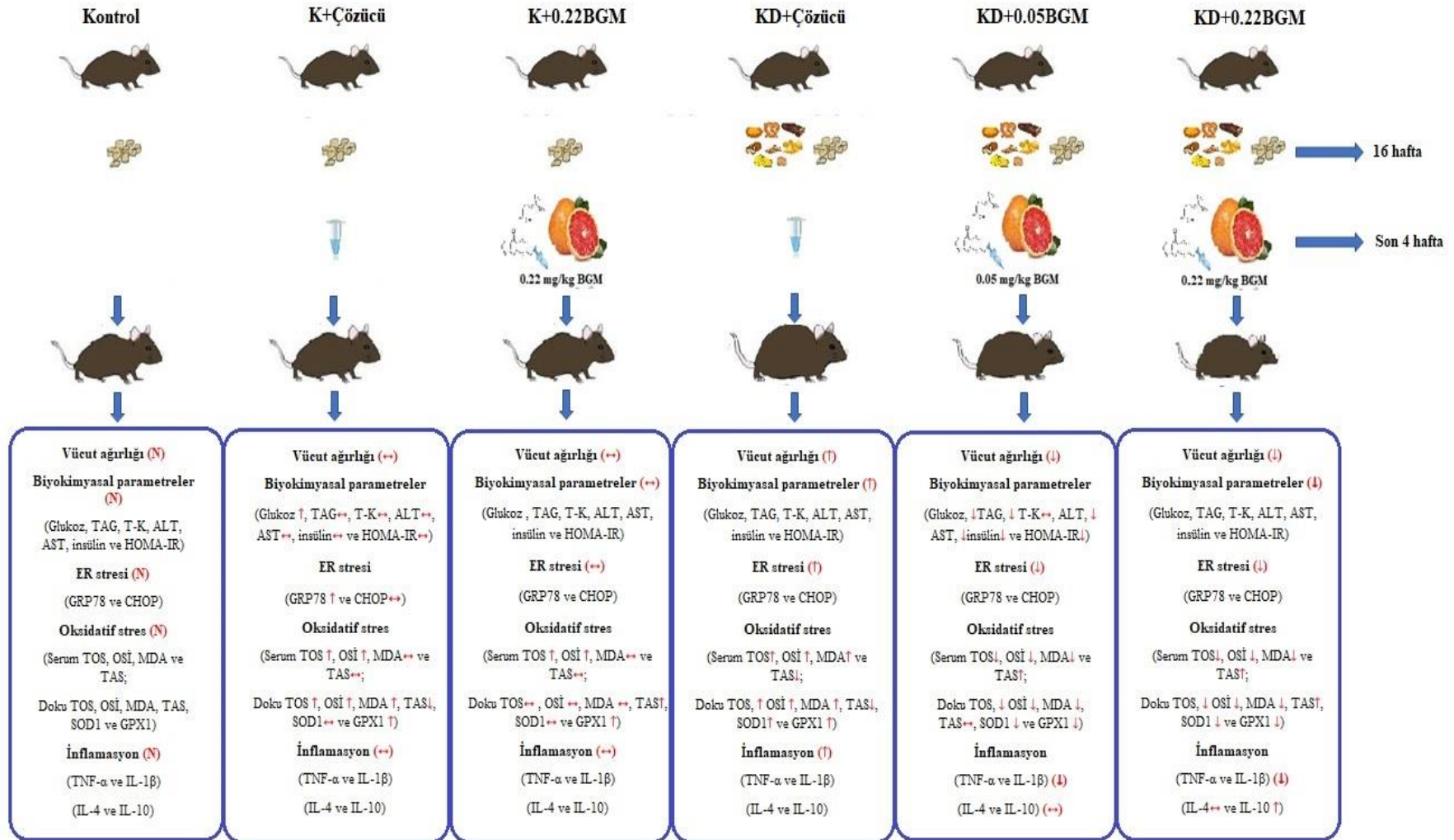
Kafeterya diyetiyle beslenen hayvanlarda karaciğer morfolojisi ve işlevi değişir. Çalışmamızda kafeterya diyeti verilen gruplarda karaciğerlerin morfolojik olarak büyük olduğunu ve üzerlerinde hasara işaret eden kırmızı büyük noktalar olduğunu gördük. Gruplara ait karaciğer dokularını histolojik olarak değerlendirdiğimizde ise kafeterya diyeti verilen fakat BGM takviyesi uygulanmayan grupta ciddi ve yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve dejeneratif hepatosit varlığı tespit ettik. Bu grupta karaciğer dokusuna ait yarı-kantitatif skorlamanın istatistiksel sonuçları da elde ettiğimiz görsel bulguları destekler nitelikteydi (Tablo 22). Elde edilen histolojik görüntüler ayrıca uzman bir patolog tarafından

da incelendi. İncelenen KD+Çözücü preparatında metabolik bir karaciğer hasarı varlığı uzman patolog tarafından da teyit edildi. Gasparin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada erkek ve dişi Swiss fareleri 14 hafta süreyle KD ile beslediklerini elde ettikleri histolojik görüntülerde karaciğerde lipid damlacıkları alanının erkek farelerden ziyade dişi farelerde görüldüğünü bildirmişlerdir (279). Zeeni ve ark. ise yaptıkları çalışmada yetişkin erkek BALB/C farelerde 14 hafta hem HFD hem de KD ile beslenen grupların karaciğerlerinde kontrollere kıyasla önemli yağlanma ve portal fibrozis olduğunu göstermişlerdir. Zeeni ve ark. yaptıkları çalışmada BALB/C fareleri kullanmalarındaki amacın KD'nin karaciğer dahil olmak üzere organ disfonksiyonu üzerindeki rolünü, C57BL/6 farelere kıyasla BALB/C farelerde daha iyi yansıtıldığını düşündüklerini bildirmişlerdir (7). Mevcut çalışmamızda karaciğer histolojisinde belirgin yağ birikimi/yağ damlacıkları görülmedi. Çalışmamızda hepatik lipid varlığı düzeyi incelenmemiş olup kalitatif bir analiz ile mevcut glikojen ve karaciğerde depolanan lipid düzeylerinin belirlenemediği fakat çalışmadan elde edilen sonuçlar üzerinde etkili olmuş olabileceği göz ardı edilmemelidir. Literatürde KD'ye ait herhangi bir standart bulunmamaktadır. Bu sebeple diyet içeriklerinin farklı olması aynı deneysel aşamalar gerçekleştirilmiş olsa dahi farklı sonuçlanabilir. Buna rağmen KD ile beslenen hem de yüksek konsantrasyonda BGM takviyesi uygulanan grupta hafif derecede inflamatuvar hücre infiltrasyonu izledik ve yarı-kantitatif skorlama sonuçları ile de teyit ettik (Tablo 22). Yine kafeterya diyeti beslenip düşük konsantrasyonda BGM takviyesi verilen grupta hafif dejeneratif hepatosit yapısı gözlemledik ve yarı-kantitatif skorlama sonuçlarımızla da eşdeğer olduğunu gördük.

Sonuç olarak kafeterya diyetinin oksidatif stres, ER stresi ve inflamasyon aracılığıyla karaciğer hasarına neden olduğu ve çeşitli doğal ürünlerin de bu hasarı azaltıcı etkilerinin olduğu bilinmektedir. Ancak bergamottinin kafeterya diyeti kaynaklı karaciğer hasarı üzerine etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışma görülmemektedir. Çalışma sonuçlarımız literatürle benzer şekilde kafeterya diyetinin ER stresine yol açtığını, oksidan dengeyi bozarak oksidatif strese neden olduğunu, artan ROS'lar nedeniyle inflamasyonun tetiklendiğini ve sonuç olarak da karaciğerde hasara neden olduğunu doğrulamaktadır. Yine sonuçlarımız bir furanokumarin olan bergamottinin radikal süpürücü aktivite ve antioksidan etki göstererek, oksidatif stres, ER stresi ve inflamasyonu düşürerek kafeterya diyetine bağlı olarak gelişen karaciğer hasarını azalttığını göstermektedir (Resim 7).

Buradan hareketle, bergamottinin ER stresini önleyici, anti-oksidatif ve anti-inflamatuvar etkinliğinin hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği konusunda daha detaylı deneysel yaklaşımların devam ettirilmesinin klinik çalışmaların önünü açabileceği düşünölmektedir. Mevcut çalışmamızın bergamottinin takviye edici bir ürün olarak gıda ve ilaç endüstrisinde karaciğer hastalıklarına karşı kullanılabilirliği ile ilgili ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.





Resim 7. Farelerde kafeterya diyeti kaynaklı karaciğer hasarına karşı bergamottinin etkilerinin incelenmesi

SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Kafeterya diyetinin farelerde hiperfaji ve kilo alımına yol açtığı, bergamottin takviyesinin ise kilo alımını azalttığı gösterildi.
2. Kafeterya diyetinin serumda glukoz, TAG, T-K, ALT, AST ve insülin düzeylerini artırdığı, genel metabolik durumu bozduğu ve ayrıca HOMA-IR skorunu da yükselterek bir nevi insülin direncine yol açtığı görüldü. Bergamottin takviyesinin artan serum biyokimyasal parametrelerini normal değer aralıklarına yaklaştırdığı bulundu.
3. Kafeterya diyetinin antioksidanların ve pro-oksidanların düzeylerini değiştirerek, ER stresi, oksidatif stres ve inflamasyonu artırarak karaciğer hasarına neden olduğu tespit edildi. BGM'nin ise karaciğerde ER stresi, oksidatif stres ve inflamasyonun azaltılmasında etkili bir takviye kaynağı olabileceği gösterildi.
4. Kafeterya diyetinin karaciğer hasarına neden olduğu ve bergamottin takviyesinin de bu hasarı azaltıcı etkisinin olduğu histopatolojik olarak da gösterildi.
5. Kafeterya diyetinin ER stresi biyobelirteçlerinden CHOP ve GRP78 gen ekspresyonları seviyelerini arttırdığı RT-PCR yöntemi ile belirlendi. Bergamottin takviyesinin artan CHOP ve GRP78 gen ekspresyonları üzerinde baskılayıcı etkisinin olduğu gösterildi.
6. Bu çalışma ile bergamottinin hasarı azaltıcı etkinliğinin gıda ve ilaç endüstrisinde takviye bir ürün olarak karaciğer hastalıklarına karşı kullanılabilirliği ile ilgili ileride yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar doğrultusunda;

1. Karaciğer dokusunda SOD ve GPX enzimlerinin aktiviteleri ve gen düzeyinde değişimlerinin incelenmesi önerilebilir.
2. Kafeterya diyetinin karaciğer dokusu üzerinde oluşturduğu hasarlar göz önüne alındığında, karaciğer hastalıkları ile ilgili çalışma yapan araştırmacıların model oluşturmada kafeterya diyetini kullanmayı değerlendirmeleri önerilebilir.
3. BGM'nin ise ER stresi yolları üzerindeki etkilerinin daha iyi aydınlatılması adına PERK, ATF-6 ve IRS1 gibi ER stresi ile ilişkili diğer proteinlere, apoptoz ile ilişkili proteinlere ve düzeylerine bakılması önerilebilir.
4. 1,1-difenil2-pikril-hidrazil radikali kullanılarak spektrofotometrik yöntemler ile doku veya serumda antioksidan kapasite ölçülebilir.
5. Karaciğerdeki metabolik parametreleri olumsuz etkileyen kafeterya diyetinin başka organlar üzerindeki etkisinin de incelenmesi; hangi metabolik yolları, ne şekilde ve nasıl etkilediğinin aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.
6. Bergamottin takviyesinin insülin direnci ve diyabet gelişimi üzerindeki etkin rolünün daha detaylı şekilde araştırılması için AMPK, p-AMPK ve uncoupling proteinlerin düzeyleri ölçülebilir.
7. Çeşitli metabolik hastalıklar açısından tek başına total kolesterol ölçümünü değerlendirmektense total kolesterolü içerisindeki yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) fraksiyonları ile birlikte değerlendirmek daha doğru olur. Çalışmamızın limitasyonlarından biri de HDL ve LDL kolesterol düzeyleri ölçümü yapılamamasıydı. İleride yapılacak olan çalışmalarda T-K ile birlikte HDL ve LDL kolesterol düzeylerine de bakılabilir.
8. Bergamottin takviyesinin farklı kronik hastalıklarda kullanımının araştırılması sağlanarak diğer klinik çalışmaların önünün de açabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Mitra VMJ (2012). Metabolic functions of the liver. *Anaesth Intens Care* 13(2): 54–55.
2. Ghafoory S, Breitkopf-Heinlein K, Li Q, Scholl C, Dooley S, Wölfl S (2013). Zonation of nitrogen and glucose metabolism gene expression upon acute liver damage in mouse. *PLoS One* 8(10): 78262.
3. Liang H, Jiang F, Cheng R, Luo Y, Wang J, Luo Z, Li M, Shen X, He F (2021). A high-fat diet and high-fat and high-cholesterol diet may affect glucose and lipid metabolism differentially through gut microbiota in mice. *Exp Anim* 70(1): 73-83.
4. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R (2021). Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature reviews. Gastroenterol Hepatol* 18(4): 223–238.
5. Lewis AR, Singh S, Youssef FF (2019). Cafeteria-diet induced obesity results in impaired cognitive functioning in a rodent model. *Heliyon* 5(3): 01412.
6. Mašek T, Barišić J, Micek V, Starčević K (2020). Cafeteria diet and high-fructose rodent models of NAFLD differ in the metabolism of important PUFA and palmitoleic acid without additional influence of sex. *Nutrients* 12(11): 3339.
7. Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH (2015). Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: A potential role of inflammation. *Inflamm Res* 64(7): 501-12.
8. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE (2018). Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15(6): 349-364.
9. Sudhakara G, Mallaiah P, Rajendran R, Saralakumari D (2018). *Caralluma fimbriata* and metformin protection of rat pancreas from high fat diet induced oxidative stress. *Biotech Histochem* 93(3): 177-187.
10. Ghorbani A, Hooshmand S (2021). Protective effects of *Morus nigra* and its phytochemicals against hepatotoxicity: A review of preclinical studies. *Pharmacology* 106(5-6): 233–243.
11. Hussain T, Tan B, Yi Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N (2016). Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxid Med Cell Longev* 7432797.
12. Tan BL, Norhaizan ME (2019). Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. *Nutrients* 11(11): 2579.

13. Chudnovskiy R, Thompson A, Tharp K, Hellerstein M, Napoli JL, Stahl A (2014). Consumption of clarified grapefruit juice ameliorates high-fat diet induced insulin resistance and weight gain in mice. *PLoS One* 9(10): 108408.
14. Hung WL, Suh JH, Wang Y (2017). Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. *J Food Drug Anal* 25(1): 71–83.
15. Suzuki K, Taniyama K, Aoyama T, Watanabe Y (2020). Bergamottin can be used to assess CYP3A-mediated intestinal first-pass metabolism without affecting P-glycoprotein-mediated efflux in rats. *Xenobiotica* 50(4): 401-407
16. Hollander CF, van Bezooijen CF, Solleveld HA (1987). Anatomy, function and aging in the mouse liver. *Arch Toxicol Suppl* (10): 244-250.
17. Kruepunga N, Hakvoort TBM, Hikspoors JPJM, Köhler SE, Lamers WH (2019). Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865(5): 869-878.
18. Tortora J, Derrickson H. (2008). Principles of anatomy and physiology, 12th Edition. Wiley, International Student Version; Sayfa: 945.
19. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH (2017). The liver. *Curr Biol* 27(21): 1147-1151.
20. Cheng ML, Nakib D, Perciani CT, MacParland SA (2021). The immune niche of the liver. *Clin Sci (Lond)* 135(20): 2445-2466
21. Jones JG (2016). Hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia* 59(6): 1098-103.
22. Kawano Y, Cohen DE (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 48(4): 434-441.
23. Zhao P, Saltiel AR (2020). From overnutrition to liver injury: AMP-activated protein kinase in nonalcoholic fatty liver diseases. *J Biol Chem* 295(34): 12279-12289.
24. Brahmi N, Feriani A, Ben Ali M, Hedfi A, Elleuch A, Ismail IA, Albogami B, Saif T, Talarmin H, El Feki A, Allagui MS (2021). Potential hepatoprotective effect of *cheatomorpha gracilis* extract against high fat diet (HFD)-induced liver damage, and its characterization by HPLC. *Braz J Biol* 82: 247102.
25. Han HS, Kang G, Kim JS, Choi BH, Koo SH (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Exp Mol Med* 48(3): 218.
26. Rives C, Fougerat A, Ellero-Simatos S, Loiseau N, Guillou H, Gamet-Payrastre L, Wahli W (2020). Oxidative stress in NAFLD: role of nutrients and food contaminants. *Biomolecules* 10(12): 1702.

27. Cena H, Calder PC (2020). Defining a healthy diet: evidence for the role of contemporary dietary patterns in health and disease. *Nutrients* 12(2): 334.
28. Yeung SSY, Kwan M, Woo J (2021). Healthy diet for healthy aging. *Nutrients* 13(12): 4310.
29. Muslu M (2019). Beslenmenin tarihsel süreçte sosyal ve uluslararası ilişkilere yansımaları. *Sosyologca Dergisi* (17): 25-30.
30. Eren E, Özer İ (2018). Eski anadolu toplumlarında beslenme alışkanlıkları. *Güncel Turizm Araştırmaları Dergisi* 308-323.
31. Eda S, Yener B, Vahdet Ö, Timur G (2018). Beslenme şeklinin zaman içindeki tarihsel yolculuğu. *SETSCI Conference Indexing System* 390-398.
32. Varlamov O (2017). Western-style diet, sex steroids and metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863(5): 1147-1155.
33. Lakerveld J, Mackenbach J (2017). The upstream determinants of adult obesity. *Obes Facts* 10(3):216-222.
34. Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W, Torres IL (2012). Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides* 38(1): 189-196.
35. Mozaffarian D, Hao T, Rimm EB, Willett WC, Hu FB (2011). Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med* 364(25): 2392-2404.
36. Gabbia D, Roverso M, Guido M, Sacchi D, Scaffidi M, Carrara M, Orso G, Russo FP, Floreani A, Bogialli S, De Martin S (2019). Western diet-induced metabolic alterations affect circulating markers of liver function before the development of steatosis. *Nutrients* 11(7): 1602.
37. Christ A, Lauterbach M, Latz E (2019). Western diet and the immune system: An inflammatory connection. *Immunity* 51(5):794-811.
38. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* (4):798-808.
39. Gelmez MY, Kasapoğlu P, Adaş ÇU, Tahralı İ, Gazioğlu SB, Çevik, Deniz G (2013). Metabolik sendromda deneysel hayvan modelleri. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2(4): 15-21.
40. Li J, Wu H, Liu Y, Yang L (2020). High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR. *Exp Anim* 69(3): 326-335.

41. Kakimoto PA, Kowaltowski AJ (2016). Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Redox Biol* 8: 216-225.
42. Sclafani A, Springer D (1976). Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav* 17(3): 461-471.
43. Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ (2016). Short-term exposure to a diet high in fat and sugar, or liquid sugar, selectively impairs hippocampal-dependent memory, with differential impacts on inflammation. *Behav Brain Res* 306:1-7.
44. Cook JB, Hendrickson LM, Garwood GM, Toungate KM, Nania CV, Morikawa H (2017). Junk food diet-induced obesity increases D2 receptor autoinhibition in the ventral tegmental area and reduces ethanol drinking. *PLoS One* 12(8): 0183685.
45. Lalanza JF, Snoeren EMS (2021). The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 122: 92-119.
46. Martire SI, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ (2013). Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity. *PLoS One* 8(4): 60407.
47. Ariyasu D, Yoshida H, Hasegawa Y (2017). Endoplasmic reticulum (ER) stress and endocrine disorders. *Int J Mol Sci* 18(2): 382.
48. Remondelli P, Renna M (2017). The endoplasmic reticulum unfolded protein response in neurodegenerative disorders and its potential therapeutic significance. *Front Mol Neurosci* 10: 187.
49. Zhang K, Kaufman RJ (2006). The unfolded protein response: A stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66(1): 102-109.
50. Vincenz L, Jäger R, O'Dwyer M, Samali A (2013). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response: targeting the Achilles heel of multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 12(6): 831-843.
51. Schröder M, Kaufman RJ (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 74:739-789.
52. Chaudhari N, Talwar P, Parimisetty A, Lefebvre d'Hellencourt C, Ravanani P (2014). A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 8: 213.
53. Hotamisligil GS (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140(6): 900-917.

54. Xu X, Lei T, Li W, Ou H (2019). Enhanced cellular cholesterol efflux by naringenin is mediated through inhibiting endoplasmic reticulum stress ATF6 activity in macrophages. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864(10): 1472-1482.
55. Salvadó L, Palomer X, Barroso E, Vázquez-Carrera M (2015). Targeting endoplasmic reticulum stress in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 26(8): 438-448.
56. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA (2019). GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci* 226: 156-163.
57. Shimizu A, Kaira K, Yasuda M, Asao T, Ishikawa O (2017). Clinical and pathological significance of ER stress marker (BiP/GRP78 and PERK) expression in malignant melanoma. *Pathol Oncol Res* 23(1):111-116.
58. Zheng YZ, Cao ZG, Hu X, Shao ZM (2014). The endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP predict disease-free survival and responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 145(2):349-358.
59. Wang HQ, Du ZX, Zhang HY, Gao DX (2007). Different induction of GRP78 and CHOP as a predictor of sensitivity to proteasome inhibitors in thyroid cancer cells. *Endocrinology* 148(7): 3258-3270.
60. Lai E, Teodoro T, Volchuk A (2007). Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology* 22: 193-201.
61. Wang J, Hu X, Jiang H (2014). ER stress-induced apoptosis: A novel therapeutic target in heart failure. *Int J Cardiol* 177(2): 564-565.
62. Sano R, Reed JC (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1833(12): 3460-3470.
63. Tavender TJ, Bulleid NJ (2010). Molecular mechanisms regulating oxidative activity of the Ero1 family in the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal* 13(8): 1177-1187.
64. Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR, Tabas I (2009). Role of ERO1- α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 186(6): 783-792.
65. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S (2019). The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front Immunol* 9: 3083.
66. Kang I, Espín JC, Carr TP, Tomás-Barberán FA, Chung S (2016). Raspberry seed flour attenuates high-sucrose diet-mediated hepatic stress and adipose tissue inflammation. *J Nutr Biochem* 32: 64-72.

67. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ (1991). Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 91(3C): 2-13.
68. Ashraf NU, Sheikh TA (2015). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Res* 49(12): 1405-1418.
69. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(17): 7915–7922.
70. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci.* 16(11): 26087–26124.
71. Kornicka K, Houston J, Marycz K (2018). Dysfunction of mesenchymal stem cells isolated from metabolic syndrome and type 2 diabetic patients as result of oxidative stress and autophagy may limit their potential therapeutic use. *Stem Cell Rev Rep* 14(3): 337-345.
72. Navarro A, Boveris A (2004). Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(5): 1244- 1249.
73. Sies H (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 4: 180-183.
74. Arjunan KP, Sharma VK, Ptasinska S (2015). Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA-a review. *Int J Mol Sci* 16(2): 2971-3016.
75. Yang B, Chen Y, Shi J (2019). Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. *Chem Rev* 119(8):4881-4985.
76. Farzaei MH, Zobeiri M, Parvizi F, El-Senduny FF, Marmouzi I, Coy-Barrera E, Naseri R, Nabavi SM, Rahimi R, Abdollahi M (2018). Curcumin in liver diseases: A systematic review of the cellular mechanisms of oxidative stress and clinical perspective. *Nutrients* 10(7): 855.
77. Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, Jiang F, Peng ZY (2019). Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 5080843.
78. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* 30(1): 11-26.
79. Forman HJ, Zhang H (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* 20(9): 689-709.

80. Higdon JV, Frei B (2003). Obesity and oxidative stress: A direct link to CVD? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(3): 365-367.
81. McCord JM (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108(8): 652-659.
82. Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C (2015). Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition* 31(7-8): 916-922.
83. Dornas W, Schuppan D (2020). Mitochondrial oxidative injury: A key player in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 319(3): 400-411.
84. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52: 794-804.
85. Demirci-Çekiç S, Özkan G, Avan A, Uzunboy S, Capanoglu E, Apak R (2021). Biomarkers of oxidative stress and antioxidant defense. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (209): 114477.
86. Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G (2016). Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 9130976.
87. Zhao H, Zhang R, Yan X, Fan K (2021). Superoxide dismutase nanozymes: An emerging star for anti-oxidation. *J Mater Chem B* 9(35): 6939-6957.
88. Sharma G, Shin EJ, Sharma N, Nah SY, Mai HN, Nguyen BT, Jeong JH, Lei XG, Kim HC (2021). Glutathione peroxidase-1 and neuromodulation: novel potentials of an old enzyme. *Food Chem Toxicol* 148: 111945.
89. Brigelius-Flohé R, Maiorino M (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1830(5): 3289-3303.
90. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 15(7): 1957-1997.
91. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T, Samini F (2017). Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. *Biomed Pharmacother* 87: 223-229.

92. Delli Bovi AP, Marciano F, Mandato C, Siano MA, Savoia M, Vajro P (2021). Oxidative stress in nonalcoholic fatty liver disease. An updated mini review. *Front Med (Lausanne)* 8: 595371.
93. Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(2): 335-344.
94. Brownlee M (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865):813-20.
95. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP (2018). Nutrients and oxidative stress: friend or foe? *Oxid Med Cell Longev* 2018: 9719584.
96. Elmarakby AA, Sullivan JC (2012). Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Ther* 30(1): 49-59.
97. Suzuki K (2019). Chronic inflammation as an immunological abnormality and effectiveness of exercise. *Biomolecules* 9(6): 223.
98. Nathan C (2002). Points of control in inflammation. *Nature* 420(6917): 846-852.
99. Calder PC, Ahluwalia N, Brouns F, Buetler T, Clement K, Cunningham K, Esposito K, Jönsson LS, Kolb H, Lansink M, Marcos A, Margioris A, Matusheski N, Nordmann H, O'Brien J, Pugliese G, Rizkalla S, Schalkwijk C, Tuomilehto J, Wärnberg J, Watzl B, Winklhofer-Roob BM (2011). Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *Br J Nutr* 106 (3): 5-78.
100. Irimia D, Wang X (2018). Inflammation-on-a-chip: probing the immune system ex vivo. *Trends Biotechnol* 36(9): 923-937.
101. Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, Kumar SS (2016). Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 5276130
102. Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M (2005). Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(2): 201-217.
103. Tao Y, Wang M, Chen E, Tang H (2017). Liver regeneration: Analysis of the main relevant signaling molecules. *Mediators Inflamm* 2017: 4256352.
104. Medzhitov R (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203): 428–435.
105. Schwabe RF, Brenner DA (2006). Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(4): 583-589.

106. Wheelhouse NM, Chan YS, Gillies SE, Caldwell H, Ross JA, Harrison DJ, Prost S (2003). TNF-alpha induced DNA damage in primary murine hepatocytes. *Int J Mol Med* 12(6): 889-894.
107. Weber A, Wasiliew P, Kracht M (2010). Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway. *Sci Signal* 3(105): cm2.
108. Dinarello CA (2010). IL-1: Discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol* 40(3): 599-606.
109. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6(4): 232-241.
110. Franceschi C, Campisi J (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69(1): 4-9.
111. Medzhitov R (2010). Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell*. 140(6): 771-776
112. Minihaane AM, Vinoy S, Russell WR, Baka A, Roche HM, Tuohy KM, Teeling JL, Blaak EE, Fenech M, Vauzour D, McArdle HJ, Kremer BH, Sterkman L, Vafeiadou K, Benedetti MM, Williams CM, Calder PC (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr* 114(7): 999-1012.
113. Ul-Haq Z, Naz S, Mesaik MA (2016). Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box. *Cytokine Growth Factor Rev* 32: 3-15.
114. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176(1): 287-292.
115. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21(5): 331-344.
116. Tanwar S, Rhodes F, Srivastava A, Trembling PM, Rosenberg WM (2020). Inflammation and fibrosis in chronic liver diseases including nonalcoholic fatty liver disease and hepatitis C. *World J Gastroenterol* 26(2): 109-133.
117. Kubes P, Jenne C (2018). Immune responses in the liver. *Annu Rev Immunol* 36: 247-277.
118. Myette-Côté É, Durrer C, Neudorf H, Bammert TD, Botezelli JD, Johnson JD, DeSouza CA, Little JP (2018). The effect of a short-term low-carbohydrate, high-fat diet with or

- without postmeal walks on glycemic control and inflammation in type 2 diabetes: A randomized trial. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 315(6): 1210-1219.
119. Lee S, Keirse KI, Kirkland R, Grunewald ZI, Fischer JG, de La Serre CB (2018). Blueberry supplementation influences the gut microbiota, inflammation, and insulin resistance in high-fat-diet-fed rats. *J Nutr* 148(2): 209-219.
 120. Thomford NE, Senthebane DA, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, Dzobo K (2018). Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *Int J Mol Sci* 19(6): 1578.
 121. Rao T, Tan Z, Peng J, Guo Y, Chen Y, Zhou H, Ouyang D (2019). The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Pharmacol Res* 146: 104283.
 122. Wang D, Hiebl V, Xu T, Ladurner A, Atanasov AG, Heiss EH, Dirsch VM (2020). Impact of natural products on the cholesterol transporter ABCA1. *J Ethnopharmacol* 249: 112444.
 123. Pilla Reddy V, Jo H, Neuhoff S (2021). Food constituent- and herb-drug interactions in oncology: Influence of quantitative modelling on drug labelling. *Br J Clin Pharmacol* 87(10): 3988-4000.
 124. Salehi B, Lopez-Jornet P, Pons-Fuster López E, Calina D, Sharifi-Rad M, Ramírez-Alarcón K, Forman K, Fernández M, Martorell M, Setzer WN, Martins N, Rodrigues CF, Sharifi-Rad J (2019). Plant-derived bioactives in oral mucosal lesions: a key emphasis to curcumin, lycopene, chamomile, aloe vera, green tea and coffee properties. *Biomolecules* 9(3): 106.
 125. Simental-Mendía LE, Gamboa-Gómez CI, Guerrero-Romero F, Simental-Mendía M, Sánchez-García A, Rodríguez-Ramírez M (2021). Beneficial effects of plant-derived natural products on nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Exp Med Biol* 1308: 257-272.
 126. Wason S, DiGiacinto JL, Davis MW (2012). Effects of grapefruit and Seville orange juices on the pharmacokinetic properties of colchicine in healthy subjects. *Clin Ther* 34(10): 2161-2173.
 127. Liu Y, Zhang S, Jiang T, Tan R, Fu Y, Yang X, Gong B, Zou Y, Li W, Zheng J (2021). Mechanistic study of bergamottin-induced inactivation of CYP2C9. *Food Chem Toxicol* 153: 112278.
 128. Liu Y, Ren C, Cao Y, Wang Y, Duan W, Xie L, Sun C, Li X (2017). Characterization and purification of bergamottin from citrus grandis (L.) osbeck cv. yongjiazaoxiangyou

and its antiproliferative activity and effect on glucose consumption in HepG2 cells. *Molecules* 22(7): 1227.

129. Lee SG, Kim K, Vance TM, Perkins C, Provatas A, Wu S, Qureshi A, Cho E, Chun OK (2016). Development of a comprehensive analytical method for furanocoumarins in grapefruit and their metabolites in plasma and urine using UPLC-MS/MS: A preliminary study. *Int J Food Sci Nutr* 67(8): 881-887.
130. Ham JR, Choi RY, Lee HI, Lee MK (2019). Methoxsalen and bergapten prevent diabetes-induced osteoporosis by the suppression of osteoclastogenic gene expression in mice. *Int J Mol Sci* 20(6): 1298.
131. Messer A, Nieborowski A, Strasser C, Lohr C, Schrenk D (2011). Major furocoumarins in grapefruit juice I: levels and urinary metabolite(s). *Food Chem Toxicol* 49(12): 3224-3231.
132. Ko JH, Arfuso F, Sethi G, Ahn KS (2018). Pharmacological utilization of bergamottin, derived from grapefruits, in cancer prevention and therapy. *Int J Mol Sci* 19(12): 4048.
133. Goosen TC, Cillie D, Bailey DG, Yu C, He K, Hollenberg PF, Woster PM, Cohen L, Williams JA, Rheeders M, Dijkstra HP (2004). Bergamottin contribution to the grapefruit juice-felodipine interaction and disposition in humans. *Clin Pharmacol Ther* 76(6): 607-617.
134. PubChem (2022). Bergamottin, analytical standard [online]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/329747253>. [Accessed 17 March 2022].
135. Rossi M, Aktar S, Davis M, Hefter Feuss E, Roman-Holba S, Wen K, Gahn C, Caruso F (2020). The grapefruit effect: Interaction between cytochrome P450 and coumarin food components, bergamottin, fraxidin and osthole. X-ray Crystal Structure and DFT Studies. *Molecules* 25(14): 3158.
136. Zsidó BZ, Balog M, Erős N, Poór M, Mohos V, Fliszár-Nyúl E, Hetényi C, Nagane M, Hideg K, Kálai T, Bognár B (2020). Synthesis of spin-labelled bergamottin: A potent CYP3A4 inhibitor with antiproliferative activity. *Int J Mol Sci* 21(2): 508.
137. Kim SM, Lee JH, Sethi G, Kim C, Baek SH, Nam D, Chung WS, Kim SH, Shim BS, Ahn KS (2014). Bergamottin, a natural furanocoumarin obtained from grapefruit juice induces chemosensitization and apoptosis through the inhibition of STAT3 signaling pathway in tumor cells. *Cancer Lett* 354(1): 153-163.

138. Ko JH, Nam D, Um JY, Jung SH, Ahn KS (2018). Bergamottin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells and weight regulation in diet-induced obese mice. *Am J Chin Med* 46(3): 601-615.
139. An N, Yang T, Zhang XX, Xu MX (2021). Bergamottin alleviates LPS-induced acute lung injury by inducing SIRT1 and suppressing NF- κ B. *Innate Immun* 27(7-8):543-552.
140. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L (2011). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 19(6): 1109-1117.
141. Kuroda K, Komori T, Ishibashi K (2020). Non-aqueous, zwitterionic solvent as an alternative for dimethyl sulfoxide in the life sciences. *Commun Chem* 3:163.
142. Baleni R, Bekker Z, Walubo A, Du Plessis JB (2015). Co-administration of fresh grape fruit juice (GFJ) and bergamottin prevented paracetamol induced hepatotoxicity after paracetamol overdose in rats. *Toxicol Rep* 2: 677-684.
143. de Castro WV, Mertens-Talcott S, Derendorf H, Butterweck V (2008). Effect of grapefruit juice, naringin, naringenin, and bergamottin on the intestinal carrier-mediated transport of talinolol in rats. *J Agric Food Chem* 56(12): 4840-4845.
144. Garg MK, Dutta MK, Mahalle N (2011). Study of beta-cell function (by HOMA model) in metabolic syndrome. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 15 (Suppl 1), 44–49.
145. Demir S, Kazaz IO, Aliyazicioglu Y, Kerimoglu G, Teoman AS, Yaman SO, Arslan A, Mentese A (2020). Effect of ethyl pyruvate on oxidative state and endoplasmic reticulum stress in a rat model of testicular torsion. *Biotech Histochem* 95 (4): 317-322.
146. Yagi K (1984). Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol* 105: 328-331.
147. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86(1): 271-278.
148. Cui H, Lin Y, Xie L, Zhao J (2021). Urantide decreases hepatic steatosis in rats with experimental atherosclerosis via the MAPK/Erk/JNK pathway. *Mol Med Rep* (4): 284.
149. Liu B, Zhang J, Sun P, Yi R, Han X, Zhao X (2019). Raw bowl tea (Tuocha) polyphenol prevention of nonalcoholic fatty liver disease by regulating intestinal function in mice. *Biomolecules* 9(9): 435.

150. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27(2-3): 95-125.
151. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11(9): 1026-1030.
152. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 5(2): 209-219.
153. Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): 45.
154. Bustin SA (2022). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29(1): 23-39.
155. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25(4): 402-408.
156. Saral Ö, Yildiz O, Aliyazicioğlu R, Yuluğ E, Canpolat S, Öztürk F, Kolaylı S (2016). Apitherapy products enhance the recovery of CCL4-induced hepatic damages in rats. *Turk J Med Sci* 46(1): 194-202.
157. Kanasaki K, Koya D (2011). Biology of obesity: Lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol* 2011:197636.
158. Milić S, Lulić D, Štimac D (2014). Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol* 20(28): 9330-9337.
159. Segula D (2014). Complications of obesity in adults: A short review of the literature. *Malawi Med J* 26(1): 20-24.
160. Rodríguez-Hernández H, Simental-Mendía LE, Rodríguez-Ramírez G, Reyes-Romero MA (2013). Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *Int J Endocrinol* 2013: 678159.
161. Maksymchuk O, Shysh A, Rosohatska I, Chashchyn M (2017). Quercetin prevents type 1 diabetic liver damage through inhibition of CYP2E1. *Pharmacol Rep* 69 (6): 1386-1392.
162. Kleinert M, Clemmensen C, Hofmann SM, Moore MC, Renner S, Woods SC, Huypens P, Beckers J, de Angelis MH, Schürmann A, Bakhti M, Klingenspor M, Heiman M, Cherrington AD, Ristow M, Lickert H, Wolf E, Havel PJ, Müller TD, Tschöp MH

- (2018). Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 14(3): 140-162.
163. Bortolin RC, Vargas AR, Gasparotto J, Chaves PR, Schnorr CE, Martinello KB, Silveira AK, Rabelo TK, Gelain DP, Moreira JCF (2018). A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *Int J Obes* 42(3): 525-534.
 164. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, Seneshaw M, Vincent R, Banini BA, Kumar DP, Daita K, Min HK, Mirshahi F, Bedossa P, Sun X, Hoshida Y, Koduru SV, Contaifer D Jr, Warncke UO, Wijesinghe DS, Sanyal AJ (2016). A diet-induced animal model of nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol* 65(3): 579-588.
 165. Farrell G, Schattenberg JM, Leclercq I, Yeh MM, Goldin R, Teoh N, Schuppan D (2019). Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis: toward optimization of their relevance to human nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 69(5): 2241-2257.
 166. Peixoto TC, Moura EG, de Oliveira E, Soares PN, Guarda DS, Bernardino DN, Ai XX, Rodrigues VDST, de Souza GR, da Silva AJR, Figueiredo MS, Manhães AC, Lisboa PC (2018). Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) extract treatment improves triglyceridemia, liver cholesterol, liver steatosis, oxidative damage and corticosteronemia in rats rendered obese by high fat diet. *Eur J Nutr* 57(5): 1829-1844.
 167. Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ (2016). Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 65(8): 1049-1061.
 168. Mullins CA, Gannaban RB, Khan MS, Shah H, Siddik MAB, Hegde VK, Reddy PH, Shin AC (2020). Neural underpinnings of obesity: The role of oxidative stress and inflammation in the brain. *Antioxidants* 9(10): 1018.
 169. Moreira EA, Fagundes RL, Filho DW, Neves D, Sell F, Bellisle F, Kupek E (2005). Effects of diet energy level and tomato powder consumption on antioxidant status in rats. *Clin Nutr* 24(6): 1038-1046.
 170. Cichoż-Lach H, Michalak A (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol* 20(25): 8082-8091.
 171. Singh S, Osna NA, Kharbanda KK (2017). Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World J Gastroenterol* 23(36): 6549-6570.

172. Zelber-Sagi S, Salomone F, Mlynarsky L (2017). The Mediterranean dietary pattern as the diet of choice for nonalcoholic fatty liver disease: evidence and plausible mechanisms. *Liver Int* 37(7): 936-949.
173. Kobori M, Takahashi Y, Sakurai M, Akimoto Y, Tsushida T, Oike H, Ippoushi K (2016). Quercetin suppresses immune cell accumulation and improves mitochondrial gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. *Mol Nutr Food Res* 60(2): 300-312.
174. Ahmed S, Khan H, Aschner M, Mirzae H, Küpeli Akkol E, Capasso R (2020). Anticancer potential of furanocoumarins: mechanistic and therapeutic aspects. *Int J Mol Sci* 21(16): 5622.
175. Rahimpour Y, Delazar A, Asnaashari S, Asgharian P (2021). The genus *Ferulago*: A review on ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology. *Iran J Pharm Res* 20(4): 352-377.
176. Vetrichelvan O, Gorjala P, Goodman O Jr, Mitra R (2021). Bergamottin a CYP3A inhibitor found in grapefruit juice inhibits prostate cancer cell growth by downregulating androgen receptor signaling and promoting G0/G1 cell cycle block and apoptosis. *PLoS One* 16(9): 0257984.
177. Zhao Z, Liao N (2021). Bergamottin induces DNA damage and inhibits malignant progression in melanoma by modulating miR-145/Cyclin D1 axis. *Onco Targets Ther* 14: 3769-3781.
178. Liu Y, Guo J, Cao J, Zhang G, Jia X, Wang P, Xiao G, Wang W (2021). Screening of botanical drugs against lassa virus entry. *J Virol* 95(8): 02429-20.
179. Liu S, Song D, Yuan D (2022). Bergamottin protects against LPS-induced endotoxic shock by regulating the NF- κ B signaling pathway. *Immunol Res* 70: 33–43.
180. Shi H, Clegg DJ (2009). Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav* 97(2): 199-204.
181. De Faveri A, De Faveri R, Broering MF, Bousfield IT, Goss MJ, Muller SP, Pereira RO, de Oliveira E Silva AM, Machado ID, Quintão NLM, Santin JR (2020). Effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.) in cafeteria diet-induced metabolic disorders. *J Ethnopharmacol* 250: 112482.
182. Lepore SM, Morittu VM, Celano M, Trimboli F, Oliverio M, Procopio A, Di Loreto C, Damante G, Britti D, Bulotta S, Russo D (2015). Oral administration of Oleuropein and

- its semisynthetic peracetylated derivative prevents hepatic steatosis, hyperinsulinemia, and weight gain in mice fed with high fat cafeteria diet. *Int J Endocrinol* 2015: 431453.
183. Li H, Lelliott C, Håkansson P, Ploj K, Tuneld A, Verolin-Johansson M, Benthem L, Carlsson B, Storlien L, Michaëlsson E (2008). Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice. *Metabolism* 57(12): 1704-1710.
 184. Lang P, Hasselwander S, Li H, Xia N (2019). Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Sci Rep* 9(1): 19556.
 185. Bonfim THFD, Tavares RL, de Vasconcelos MHA, Gouveia M, Nunes PC, Soares NL, Alves RC, de Carvalho JLP, Alves AF, Pereira RA, Cardoso GA, Silva AS, Aquino JS (2021). Potentially obesogenic diets alter metabolic and neurobehavioural parameters in wistar rats: A comparison between two dietary models. *J Affect Disord* 279: 451-461.
 186. Sahi J, Reyner EL, Bauman JN, Gueneva-Boucheva K, Burleigh JE, Thomas VH (2002). The effect of bergamottin on diazepam plasma levels and P450 enzymes in beagle dogs. *Drug Metab Dispos* 30(2): 135-140.
 187. Chemical, Cayman (2020). Library services electronic resources [online]. Available from: <https://www.caymanchem.com/product/10009439/bergamottin> [Accessed 11 October 2020].
 188. Hwang YP, Yun HJ, Choi JH, Kang KW, Jeong HG (2010). Suppression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by bergamottin via the inhibition of protein kinase Cdelta/p38 mitogen-activated protein kinase and JNK/nuclear factor-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol Nutr Food Res* 54 (7): 977-990.
 189. Ranneh Y, Saulol Hamid NF, Goh Y, Hashim Z, Abdulwahid S (2019). Dimethyl sulfoxide and their toxicity. *Int J Pharm* 5
 190. Kollerup Madsen B, Hilscher M, Zetner D, Rosenberg J (2018). Adverse reactions of dimethyl sulfoxide in humans: A systematic review. *F1000Res* 7: 1746.
 191. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50(5): 600-613.
 192. Brandimarti P, Costa-Júnior JM, Ferreira SM, Protzek AO, Santos GJ, Carneiro EM, Boschero AC, Rezende LF (2013). Cafeteria diet inhibits insulin clearance by reduced

- insulin-degrading enzyme expression and mRNA splicing. *J Endocrinol* 219(2): 173-182.
193. Leigh SJ, Kendig MD, Morris MJ (2019). Palatable western-style cafeteria diet as a reliable method for modeling diet-induced obesity in rodents. *J Vis Exp*. 153
 194. Răzvan-Valentin S, Güler SA, Utkan T, Şahin TD, Gacar G, Yazir Y, Rencber SF, Mircea L, Cristian B, Bogdan P, Utkan NZ (2022). Etanercept prevents endothelial dysfunction in cafeteria diet-fed rats. *Int J Environ Res Public Health* 19(4): 2138.
 195. Li Y, Zhou H, Wang F, Han L, Liu M, Li Y, Wang Z, Tang M, Zhang W, Zhong M (2018). Overexpression of PTPN2 in visceral adipose tissue ameliorated atherosclerosis via T cells polarization shift in diabetic Apoe^{-/-} mice. *Cell Physiol Biochem* 46(1): 118-132.
 196. Peng XG, Ju S, Qin Y, Fang F, Cui X, Liu G, Ni Y, Teng GJ (2011). Quantification of liver fat in mice: comparing dual-echo Dixon imaging, chemical shift imaging, and ¹H-MR spectroscopy. *J Lipid Res* 52(10): 1847-1855.
 197. Wang W, Xu AL, Li ZC, Li Y, Xu SF, Sang HC, Zhi F (2020). Combination of probiotics and salvia miltiorrhiza polysaccharide alleviates hepatic steatosis via gut microbiota modulation and insulin resistance improvement in high fat-induced NAFLD mice. *Diabetes Metab J* 44(2): 336-348.
 198. Oliva L, Baron C, Fernández-López JA, Remesar X, Alemany M (2015). Marked increase in rat red blood cell membrane protein glycosylation by one-month treatment with a cafeteria diet. *PeerJ* 3: 1101.
 199. Sack M, Lenz JN, Jakovcevski M, Biedermann SV, Falfán-Melgoza C, Deussing J, Bielohuby M, Bidlingmaier M, Pfister F, Stalla GK, Sartorius A, Gass P, Weber-Fahr W, Fuss J, Auer MK (2017). Early effects of a high-caloric diet and physical exercise on brain volumetry and behavior: A combined MRI and histology study in mice. *Brain Imaging Behav* 11(5): 1385-1396.
 200. Muntzel MS, Al-Naimi OA, Barclay A, Ajasin D (2012). Cafeteria diet increases fat mass and chronically elevates lumbar sympathetic nerve activity in rats. *Hypertension* 60(6): 1498-1502.
 201. Sierra-Cruz M, Miguéns-Gómez A, Grau-Bové C, Rodríguez-Gallego E, Blay M, Pinent M, Ardévol A, Terra X, Beltrán-Debón R (2021). Grape-Seed proanthocyanidin extract reverts obesity-related metabolic derangements in aged female rats. *Nutrients* 13(6): 2059.

202. Wang LY, Cheng KC, Li Y, Niu CS, Cheng JT, Niu HS (2017). The dietary furocoumarin imperatorin increases plasma GLP-1 levels in type 1-like diabetic rats. *Nutrients* 9(11): 1192.
203. Lambert JE, Ramos-Roman MA, Browning JD, Parks EJ (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 146(3): 726-735.
204. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci* 75(18): 3313-3327.
205. Aouichat S, Chayah M, Bouguerra-Aouichat S, Agil A (2020). Time-restricted feeding improves body weight gain, lipid profiles, and atherogenic indices in cafeteria-diet-fed rats: role of browning of inguinal white adipose tissue. *Nutrients* 12(8): 2185.
206. Thompson V, Costa N, Martino HP, Maria CD (2018). The effect of micronized corn fiber on body weight, glycemia, and lipid metabolism in rats fed cafeteria diet. *Food Sci. Technol* 38(3).
207. Rodríguez V, Plavnik L, Tolosa de Talamoni N (2018). Naringin attenuates liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 105: 95-102.
208. Bunbupha S, Prasarttong P, Poasakate A, Manesai P, Pakdeechote P (2021). Imperatorin alleviates metabolic and vascular alterations in high-fat/high-fructose diet-fed rats by modulating adiponectin receptor 1, eNOS, and p47phox expression. *Eur J Pharmacol* 899: 174010.
209. De Marco P, Henriques AC, Azevedo R, Sá SI, Cardoso A, Fonseca B, Barbosa J, Leal S (2021). Gut Microbiome composition and metabolic status are differently affected by early exposure to unhealthy diets in a rat model. *Nutrients* 13(9): 3236.
210. Nunes-Souza V, César-Gomes CJ, Da Fonseca LJ, Guedes Gda S, Smaniotto S, Rabelo LA (2016). Aging increases susceptibility to high fat diet-induced metabolic syndrome in C57BL/6 mice: improvement in glycemic and lipid profile after antioxidant therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 1987960.
211. Büyükdere Y (2018). Sıçanlarda kafeterya diyeti ve yüksek yağlı diyetin obezite ile ilişkili bazı biyokimyasal parametreler üzerine etkilerinin karşılaştırılması. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Ankara.

212. Wang Q, Ou Y, Hu G, Wen C, Yue S, Chen C, Xu L, Xie J, Dai H, Xiao H, Zhang Y, Qi R (2020). Naringenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease by down-regulating the NLRP3/NF- κ B pathway in mice. *Br J Pharmacol* 177(8): 1806-1821.
213. Peng C, Stewart AG, Woodman OL, Ritchie RH, Qin CX (2020). Non-alcoholic steatohepatitis: A review of its mechanism, models and medical treatments. *Front Pharmacol* 11: 603926.
214. Lala V, Goyal A, Minter DA. Liver function tests. 2021 Aug 20. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 PMID: 29494096.
215. Ulla A, Alam MA, Sikder B, Sumi FA, Rahman MM, Habib ZF, Mohammed MK, Subhan N, Hossain H, Reza HM (2017). Supplementation of *Syzygium cumini* seed powder prevented obesity, glucose intolerance, hyperlipidemia and oxidative stress in high carbohydrate high fat diet induced obese rats. *BMC Complement Altern Med* 17(1): 289.
216. L E Mballa D, Yadang FSA, Tchamgoue AD, Mba JR, Tchokouaha LRY, M Biang E, T Tchinda A, Djomeni Dzeufiet DP, Agbor GA (2021). Cafeteria diet-induced metabolic and cardiovascular changes in rats: The role of piper nigrum leaf extract. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021: 5585650.
217. Edgerton DS, Kraft G, Smith M, Farmer B, Williams PE, Coate KC, Printz RL, O'Brien RM, Cherrington AD (2017). Insulin's direct hepatic effect explains the inhibition of glucose production caused by insulin secretion. *JCI Insight* 2(6): 91863.
218. Petersen MC, Shulman GI (2018). Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev* 98(4): 2133-2223.
219. Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A (2019). Insulin resistance: review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol* 234(6): 8152-8161.
220. Gu L, Ding X, Wang Y, Gu M, Zhang J, Yan S, Li N, Song Z, Yin J, Lu L, Peng Y (2019). Spexin alleviates insulin resistance and inhibits hepatic gluconeogenesis via the FoxO1/PGC-1 α pathway in high-fat-diet-induced rats and insulin resistant cells. *Int J Biol Sci* 15(13): 2815-2829.
221. Kim JM, Lee U, Kang JY, Park SK, Kim JC, Heo HJ (2020). Matcha improves metabolic imbalance-induced cognitive dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 8882763.

222. Castell-Auví A, Cedó L, Pallarès V, Blay M, Ardévol A, Pinent M (2012). The effects of a cafeteria diet on insulin production and clearance in rats. *Br J Nutr* 108(7): 1155-1162.
223. Zayas-Arrabal J, Alquiza A, Rodríguez-de-Yurre A, Echeazarra L, Fernández-López V, Gallego M, Casis O (2021). Kv1.3 channel blockade improves inflammatory profile, reduces cardiac electrical remodeling, and prevents arrhythmia in type 2 diabetic rats. *Cardiovasc Drugs Ther*
224. Buyukdere Y, Gulec A, Akyol A (2019). Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. *PeerJ* 7: e6656.
225. Teixeira D, Cecconello AL, Partata WA, de Fraga LS, Ribeiro MFM, Guedes RP (2019). The metabolic and neuroinflammatory changes induced by consuming a cafeteria diet are age-dependent. *Nutr Neurosci* 22(4): 284-294.
226. Dara L, Ji C, Kaplowitz N (2011). The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. *Hepatology* 53(5): 1752-1763.
227. Ren Y, Song X, Tan L, Guo C, Wang M, Liu H, Cao Z, Li Y, Peng C (2020). A review of the pharmacological properties of psoralen. *Front Pharmacol* 11: 571535.
228. Wang Y, Zhou X, Zhao D, Wang X, Gurley EC, Liu R, Li X, Hylemon PB, Chen W, Zhou H (2020). Berberine inhibits free fatty acid and LPS-induced inflammation via modulating ER stress response in macrophages and hepatocytes. *PLoS One* 15(5): 0232630.
229. Li X (2018). Endoplasmic reticulum stress regulates inflammation in adipocyte of obese rats via toll-like receptors 4 signaling. *Iran J Basic Med Sci* 21(5): 502-507.
230. Shangguan WJ, Zhang YH, Li ZC, Tang LM, Shao J, Li H (2017). Naringin inhibits vascular endothelial cell apoptosis via endoplasmic reticulum stress- and mitochondrial-mediated pathways and promotes intraosseous angiogenesis in ovariectomized rats. *Int J Mol Med* 40(6): 1741-1749.
231. Tam AB, Mercado EL, Hoffmann A, Niwa M (2012). ER stress activates NF- κ B by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. *PLoS One* 7 (10): 45078.
232. Kim SM, Lee EJ, Lee JH, Yang WM, Nam D, Lee JH, Lee SG, Um JY, Shim BS, Ahn KS (2016). Simvastatin in combination with bergamottin potentiates TNF-induced apoptosis through modulation of NF- κ B signalling pathway in human chronic myelogenous leukaemia. *Pharm Biol* 54 (10): 2050-2060.

233. Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38(12): 1103-1111.
234. Erel O (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 37(4): 277-285.
235. Gupta S, Kunti S, Chatterjee S, Dutta S, Nath S, Das HN (2016). Oxidative stress index as a biochemical parameter in major depressive disorder. *Asian J Med Sci* 7(5): 31–35.
236. Abuelo A, Hernández J, Benedito JL, Castillo C (2013). Oxidative stress index (OSI) as a new tool to assess redox status in dairy cattle during the transition period. *Animal* 7(8): 1374-1378.
237. Tanrıkulu-Küçük S, Başaran-Küçükgergin C, Söğüt İ, Tunçdemir M, Doğru-Abbasoğlu S, Seyithanoğlu M, Koçak H, Öner-İyidoğan Y (2019). Dietary curcumin and capsaicin: relationship with hepatic oxidative stress and apoptosis in rats fed a high fat diet. *Adv Clin Exp Med* 28(8): 1013-1020.
238. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 360438.
239. Hendrikx T, Binder CJ (2020). Oxidation-specific epitopes in non-alcoholic fatty liver disease. *Front Endocrinol* 11: 607011.
240. Guedine CRC, Pordeus LCM, Riul TR, Jordão AA Júnior, Almeida SS (2020). Cafeteria diet during lactation and/or post-lactation altered lipid profile/lipid peroxidation and increased anxiety-like behavior in male rat offspring. *Nutr Neurosci* 23(7): 526-536.
241. Kabasakal Çetin A, Alkan Tuğ T, Güleç A, Akyol A (2021). Effects of maternal taurine supplementation on maternal dietary intake, plasma metabolites and fetal growth and development in cafeteria diet fed rats. *PeerJ* 9: 11547.
242. Phuwapraisrisan P, Surapinit S, Tip-Pyang S (2006). A novel furanocoumarin from *Feroniella lucida* exerts protective effect against lipid peroxidation. *Phytother Res* 20 (8): 708-710.
243. Arya A, Azarmehr N, Mansourian M, Doustimotlagh AH (2021). Inactivation of the superoxide dismutase by malondialdehyde in the nonalcoholic fatty liver disease: A combined molecular docking approach to clinical studies. *Arch Physiol Biochem* 127(6): 557-564.

244. Yanase S, Onodera A, Tedesco P, Johnson TE, Ishii N (2009). SOD-1 deletions in *Caenorhabditis elegans* alter the localization of intracellular reactive oxygen species and show molecular compensation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (5): 530-539.
245. Bouanane S, Benkalfat NB, Baba Ahmed FZ, Merzouk H, Mokhtari NS, Merzouk SA, Gresti J, Tessier C, Narce M (2009). Time course of changes in serum oxidant/antioxidant status in overfed obese rats and their offspring. *Clin Sci* 116(8): 669-680.
246. Morais Mewes J, Rodrigues Silva Gasparin F, Yoshida T, Amâncio Daniel da Silva M, Raquel Marçal Natali M, Francisco Veiga Bizerra P, Sayuri Utsunomiya K, Hideo Gilglioni E, Shigueaki Mito M, Cristiane Mantovanelli G, Thais Lima de Souza B, Makiyama Klosowski E, Luiza Ishii-Iwamoto E, Constantin J, Polimeni Constantin R (2019). The role of mitochondria in sex-dependent differences in hepatic steatosis and oxidative stress in response to cafeteria diet-induced obesity in mice. *Nutrients* 11(7): 1618.
247. Molina N, Bolin AP, Otton R (2015). Green tea polyphenols change the profile of inflammatory cytokine release from lymphocytes of obese and lean rats and protect against oxidative damage. *Int Immunopharmacol* 28(2): 985-996.
248. Lin R, Piao M, Song Y, Liu C (2020). Quercetin suppresses AOM/DSS-induced colon carcinogenesis through its anti-inflammation effects in mice. *J Immunol Res* 2020: 9242601.
249. Cheng Y, Xu T, Li S, Ruan H (2019). GPX1, a biomarker for the diagnosis and prognosis of kidney cancer, promotes the progression of kidney cancer. *Aging* 11(24): 12165-12176.
250. Murano K, Ogino H, Okuno T, Arakawa T, Ueno H (2018). Role of supplementary selenium on the induction of insulin resistance and oxidative stress in NSY mice fed a high fat diet. *Biol Pharm Bull* 41(1): 92-98.
251. Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert W (2016). A high-fat, high-fructose diet induces antioxidant imbalance and increases the risk and progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Scientifica* 2016: 5029414.
252. Dani C, Gonçalves LK, Proença IT, Andrade FO, Hilakivi-Clarke L (2020). Effects of maternal grape juice intake on unfolded protein response in the mammary glands of offspring of high fat diet fed rat dams. *Nutrients* 12(8): 2253.

253. Wali AF, Rashid S, Rashid SM, Ansari MA, Khan MR, Haq N, Alhareth DY, Ahmad A, Rehman MU (2020). Naringenin regulates Doxorubicin-induced liver dysfunction: impact on oxidative stress and inflammation. *Plants* 9(4): 550.
254. Halliwell B (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev* 52(8): 253-265.
255. Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* 1804(2): 245-262.
256. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13(10): 572-584.
257. Girennavar B, Jayaprakasha GK, Jadegoud Y, Nagana Gowda GA, Patil BS (2007). Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranylcoumarin from grapefruit. *Bioorg Med Chem* 15 (11): 3684-3691.
258. Veith A, Moorthy B (2018). Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Curr Opin Toxicol* 7: 44-51.
259. Li G, Xiang S, Pan Y, Long X, Cheng Y, Han L, Zhao X (2021). Effects of cold-pressing and hydrodistillation on the active non-volatile components in lemon essential oil and the effects of the resulting oils on aging-related oxidative stress in mice. *Front Nutr* 8: 689094.
260. Schwabe RF, Brenner DA (2006). Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(4): 583-589.
261. Manco M, Marcellini M, Giannone G, Nobili V (2007). Correlation of serum TNF-alpha levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 127(6): 954-960.
262. Gil-Cardoso K, Ginés I, Pinent M, Ardévol A, Terra X, Blay M (2017). A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. *Br J Nutr* 117(2): 218-229.
263. Machado MV, Michelotti GA, Xie G, Almeida Pereira T, Boursier J, Bohnic B, Guy CD, Diehl AM (2015). Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PLoS One* 10(5): 0127991.
264. Rehman K, Munawar SM, Akash MSH, Buabeid MA, Chohan TA, Tariq M, Jabeen K, Arafa EA (2020). Hesperidin improves insulin resistance via down-regulation of

inflammatory responses: biochemical analysis and in silico validation. *PLoS One* 15(1): 0227637.

265. Mahmoud AM, Ashour MB, Abdel-Moneim A, Ahmed OM (2012). Hesperidin and naringin attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high fat fed/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *J Diabetes Complications* 26(6): 483-490.
266. Sasaki M, Elrod JW, Jordan P, Itoh M, Joh T, Minagar A, Alexander JS (2004). CYP450 dietary inhibitors attenuate TNF- α -stimulated endothelial molecule expression and leukocyte adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* 286 (4): 931-939.
267. Hansen MK, Taishi P, Chen Z, Krueger JM (1998). Cafeteria feeding induces interleukin-1 β mRNA expression in rat liver and brain. *Am J Physiol* 274(6): 1734-1739.
268. Sagae SC, Zanardini B, Ribeiro-Paz ED, Amaral AC, Bronczek GA, Lubaczeuski C, Grassioli S, Koehler-Santos P, de Oliveira JR, Donadio MVF, Rainecki C (2018). Metabolic dysfunction in a rat model of early-life scarcity-adversity: Modulatory role of cafeteria diet. *Exp Physiol* 103(11): 1481-1493.
269. Meng LQ, Yang FY, Wang MS, Shi BK, Chen DX, Chen D, Zhou Q, He QB, Ma LX, Cheng WL, Xing NZ (2018). Quercetin protects against chronic prostatitis in rat model through NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Prostate* 78(11): 790-800.
270. Yang H, Yang T, Heng C, Zhou Y, Jiang Z, Qian X, Du L, Mao S, Yin X, Lu Q (2019). Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice. *Phytother Res* 33(12): 3140-3152.
271. Lu Z, He B, Chen Z, Yan M, Wu L (2020). Anti-inflammatory activity of berberine in non-alcoholic fatty liver disease via the Angptl2 pathway. *BMC Immunol* 21(1): 28.
272. Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM (2014). Regulation of the anti-inflammatory cytokines Interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. *Front Immunol* 5: 253.
273. Lin SY, Yang CP, Wang YY, Hsiao CW, Chen WY, Liao SL, Lo YL, Chang YH, Hong CJ, Chen CJ (2020). Interleukin-4 improves metabolic abnormalities in leptin-deficient and high-fat diet mice. *Int J Mol Sci* 21(12): 4451.
274. Toledo RCL, Brito LF, Caetano MMM, Nakajima VM, da Silva BP, Soares FEF, Martino HSD, de Queiroz JH (2019). Acute treatment with *Mangifera indica* L. leaf

- extract attenuates liver inflammation in rats fed a cafeteria diet. *Food Funct* 10(8): 4861-4867.
275. Dias FM, Leffa DD, Daumann F (2014). Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) juice intake protects against alterations to proteins involved in inflammatory and lipolysis pathways in the adipose tissue of obese mice fed a cafeteria diet. *Lipids Health Dis* 13: 24.
 276. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH (2014). Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res* 3: 85.
 277. Mori R, Wang Q, Danenberg KD, Pinski JK, Danenberg PV (2008). Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate* 68 (14): 1555-1560.
 278. Ruan L, Li F, Li S, Zhang M, Wang F, Lv X, Liu Q (2021). Effect of different exercise intensities on hepatocyte apoptosis in HFD-induced NAFLD in rats: The possible role of endoplasmic reticulum stress through the regulation of the IRE1/JNK and eIF2 α /CHOP signal pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2021: 6378568.
 279. Gasparin FRS, Carreño FO, Mewes JM, Gilglioni EH, Pagadigorria CLS, Natali MRM, Utsunomiya KS, Constantin RP, Ouchida AT, Curti C, Gaemers IC, Elferink RPJO, Constantin J, Ishii-Iwamoto EL (2018). Sex differences in the development of hepatic steatosis in cafeteria diet-induced obesity in young mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1864(7): 2495-2509.