

**T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YAĞ ASİDİ DİYETİNİN KARACİĞERDE MITOKONDRI
ÜZERİNE BİOENERJETİK ETKİLERİ**

Ahmed Saleh Daw SMEA

**Danışman
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Nejdet GÜLTEPE
Doç. Dr. Deniz ACARLI
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin GÜLTEPE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

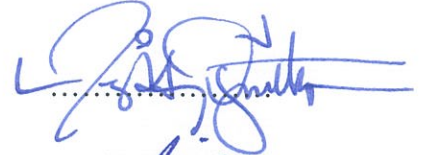
KASTAMONU – 2019

TEZ ONAYI

Ahmed Saleh Daw SMEA tarafından hazırlanan "**Yağ Asidi Diyetinin Karaciğerde Mitokondri Üzerine Bioenerjetik Etkileri**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç. Dr. Nejdet GÜLTEPE
Atatürk Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Deniz ACARLI
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi



Jüri Üyesi

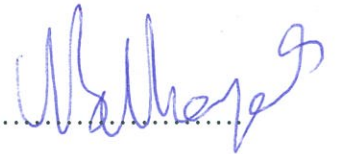
Dr. Öğr. Üyesi Yasemin GÜLTEPE
Kastamonu Üniversitesi



24/01/2020

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Nur BELKAYALI



TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.



Ahmed Saleh Daw SMEA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YAĞ ASİDİ DİYETİNİN KARACİĞERDE MİTOKONDİRİ ÜZERİNE BİOENERJETİK ETKİLERİ

Ahmed Saleh Daw SMEA

Kastamonu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Genetik ve Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nejdet GÜLTEPE

Obezite temel olarak, vücutta dolaşan artan yağ asitleri ile sonuçlanan yüksek yağ içeren bir diyetin tüketilmesinden kaynaklanır. Bu lipit metabolitlerinin, hücre içi glikoz oksidasyon işlemi etkileyen oksidatif stresin artmasına ve böylece mitokondri biyogenezini etkileyen reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olan bir dizi metabolik yolu değiştirdiği gösterilmiştir. Doymuş yağ asitleri açısından zengin diyetler bazal oranların azalmasına yol açtığından, ağırlıklı olarak doymamış yağ asitleri içeren diyetlerle karşılaştırıldığında daha yüksek vücut ağırlıkları ve yağ kazancı, diyet yağ içeriği ve yağ asidi doyumluğu, mitokondriyal zarları içerenler de dahil olmak üzere lipit çift katmanlarının yapısını etkiler. Mitokondriyal membran akışkanlığındaki bozulmaları, taşıyıcıların fonksiyonlarını, kalsiyum dinamiğini, gen ekspresyonunu ve transkripsiyon sonrası protein modifikasyonlarını içerir. Bu nedenle mitokondriyal fonksiyon ve ROS üretimi bu nedenle diyetel yağ alımından etkilenmelidir. Bu bağlantılar hayvan çalışmalarıyla da gösterilmiştir.

Bu çalışmada üç grup fare üç farklı diyet rejimlerine tabi tutuldu. (birisi normal diyet, diğer ikisi doymuş yağ (HF) ile beslendi. HFD'lerden biri yağın %50sine sahipti ve n-3 bakımından zengin yağ asitlerine sahip menhaden yağı olarak verildi). Numuneler farelerin karaciğerlerinden toplandı.

Elde ettiğimiz veriler bize HF'nin mitokondriyal biyoenerjettiği bozduğunu söylerken, menhaden yağında bulunan n-3 yağ asitleri doymuş yağ yerine kullanıldığında faydalar sunabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Obezite, yağ asitleri, doymuş yağlar (HF), menhaden yağı (MO), mitokondriyal biyoenerjetik, karaciğer

2019, 47 sayfa

Bilim Kodu: 923

ABSTRACT

MSc. Thesis

EFFECTS OF FATTY ACID DIET ON MITOCHONDRIA BIOENERGETICS OF THE LIVER

Ahmed Saleh Daw SMEA
Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Genetics and Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nejdet GÜLTEPE

Abstract: Obesity is mainly caused by consuming a high-fat diet that results in increased fatty acids circulating throughout the body. These lipid metabolites have been shown to alter a number of metabolic pathways leading to increased oxidative stress affecting the intracellular glucose oxidation process and thus to the formation of reactive oxygen species (ROS) affecting mitochondrial biogenesis. Because diets rich in saturated fatty acids lead to a decrease in basal rates, higher body weights and fat gain compared to diets containing predominantly unsaturated fatty acids, dietary fat content and fatty acid saturation, including lipid mitochondrial membranes Affects the structure. Disorders of mitochondrial membrane fluidity include the functions of carriers, calcium dynamics, gene expression and post-translational protein modifications. Therefore, mitochondrial function and ROS production should therefore be influenced by dietary fat intake. These links have also been demonstrated in animal studies.

In this study, three groups of mice were subjected to three different dietary regimens. (one was fed on a normal diet, the other two fed with saturated fat (HF). One of the HFDs had 50% of fat and was given as menhaden oil with n-3-rich fatty acids). Samples were collected from the livers of the mice.

Our data suggest that HF disrupts mitochondrial bioenergetics, while n-3 fatty acids in menhaden oil may offer benefits when used in place of saturated fat.

Key Words: Obesity, fatty acids, saturated fats (HF), menhaden oil (MO), mitochondrial bioenergetics, liver

2019, 47 pages

Science Code: 923

TEŞEKKÜR

Her şeyden önce, hayatımdaki her şey için Allah'a şükrediyorum.

Tez çalışmam süresince yapmış olduğu destekler ve yol göstericiliği ayrıca araştırmacı bir bilim insanı olmam yolundaki paha biçilmez tavsiyeleri için Danışmanım Doç. Dr. Nejdet GÜLTEPE'ye teşekkürlerimi sunmak isterim.

Hayatım boyunca bana her türlü desteği veren kocama, aileme ve ailemin her üyesine ayrı ayrı minnettarlığımı sunarım.

Eğitim almamda konusunda verdiği burs ve desteklerden dolayı ülkem Libya'ya ve kucak açıp ülkemde olduğum hissiyatını yaşamamı sağlayan Türkiye Cumhuriyeti'ne şükranlarımı arz ederim.

Ahmed Saleh Daw SMEA
Kastamonu, Ocak, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI.....	ii
TAAHHÜTNAME.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xii
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Obezite.....	2
1.1.1. Epidemi.....	2
1.1.2. Sınıflandırma	3
1.1.3. Obezite Komplikasyonları	4
1.1.4. Önlem Ve Tedavi	6
1.2. Karaciğer	6
1.2.1. Temel Karaciğer Fizyolojisi	6
1.2.2. Alkolden Bağımsız Karaciğer Yağlanması	6
1.3. Mitokondri.....	7
1.3.1. Mitokondri Biyoenerjети	7
1.3.2. Karbohidratlar Ve TCA Döngüsü İçin Alt-Tabakalar Olarak Yağ Asitleri	8
1.3.3. TCA Döngüsü Ve Oluşturulan İndirgeyici Eşdeğerler.....	9
1.3.4. Elektron Taşıma Sistemi.....	10
1.3.5. Oksidatif Stress	11
1.4. Obezite Gelişiminde Diyet	14
1.4.1. Diyetin Obezitenin Başlangıcındaki Rolü	14
1.4.2. Doymuş Yağ Asitleri	14

1.4.3. Doymamış Yağ Asitleri	14
1.4.4. Yağ Asitlerinin Metabolizması.....	15
1.5. Genel Değerlendirme ve Amaç	16
2. MATERYAL VE METOD	23
2.1. Deney Hayvanı	23
2.2. Diyetler	23
2.3. Yem Alımının Değerlendirilmesi.....	23
2.4. Dolaylı Kalorimetre.....	24
2.5. Numune Toplama	25
2.6. Karaciğerden Mitokondri İzolasyonu.....	25
2.7. Mitokondri Solunum Hızı	25
2.8. Mitokondri Hidrojenperoksit Üretimi	26
2.9. Trigliserit (TG) Düzeylerinin Ölçümü	27
2.10. Western Blotlama	28
2.11. SDS-PAGE Ve İmmünoBlotlama.....	28
2.12. İstatistiksel Analizler	29
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	30
3.1. Diyetin Vücut Ağırlığına Etkisi	30
3.2. Diyetin Vücut Solunumuna Etkisi.....	30
3.3. Mitokondriyal İşlev	32
3.4. Mitokondri Hidrojenperoksit Üretimi	34
3.5. Diyetin Trigliserit Düzeyleri Üzerine Etkisi	35
3.6. Karaciğerde Oksidatif Stresin Etkileri	37
4. SONUÇ	38
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

-	Negatif
+	Pozitif
°C	Santigrat derece
°F	Fahrenhayt derece
Cl	Klor
CO ₃	Karbonat
FA	Yağ asidi
FFA	Serbest yağ asidi
g	Gram
H ₂	Hidrojen
H ₂ S	H ₂ S üretimi
HCO ₃	Bikarbonat
HFD	Yüksek yağlı diyet
HUFA	Yüksek doymamış yağ asidi
J	Jul
K	Potasyum
kg	kilogram
kJ	Kilojul
L	Litre
mg L ⁻¹	Milligram / Litre
MgCl ₂	Magnezyum klorür
mL L ⁻¹	Miligram / Litre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mol	Molar
MUFA	Tekli doymamış yağ asidi
Na	Sodyum
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NaCl	Sodyum klorür
NaCl ₂	Sodyum diklorür
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
NEFA	Esterleşmiş yağ asidi
O	Oksijen
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi
SFA	Doymuş yağ asidi
UFA	Doymamış yağ asidi
VKİ	Vücut kitle indeksi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Obezite ve ilgili tıbbi komplikasyonlar.....	5
Şekil 1.2. Karaciğer vaskülarizasyonu	7
Şekil 1.3. Elektron taşıma zincirinin biyoenerjetiği ve TCA veya Krebs döngüsü.....	9
Şekil 1.4. Mitokondride oksidatif fosforilasyon	13
Şekil 1.5. Yağ asitlerinin metabolizması.....	16



TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1.1. VKİ ve bel çevresi ile fazla kilo ve obezitenin sınıflandırılması.....	4
Tablo 3.1. Farklı diyetlerin ağırlık bakımından etkisi.....	30



GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa
Grafik 1.1. Dünyada obezite prevalansı (WHO).....	3
Grafik 3.1. Kontrol (C), yüksek yağ (HF-karışımı) veya menhaden yağlı (MO) HF ile beslenen farelerde vücut solunum parametreleri	31
Grafik 3.2. Karaciğerde mitokondriyal oksijen tüketimi	32
Grafik 3.3. Deneysel diyet farelerinin karaciğer mitokondriileri ile solunum durumlarını temsil eden ve kelepçeli ADP'nin 4. durumdan 3. duruma değişen farklı seviyelerdeki solunumları	33
Grafik 3.4. Mitokondri solunum hızı. Substrat olarak süksinat kullanılarak solunum kontrol oranının (RCR) ölçümü	33
Grafik 3.5. Mitokondri solunum hızı. Solunum kontrol oranının (RCR) kombine substratların (süksinat, glutamat ve malat) ölçümü.....	34
Grafik 3.6. Deneysel diyetlerle beslenen farelerin karaciğer mitokondriyle H ₂ O ₂ üretimi.....	36
Grafik 3.7. Diyetin karaciğer dokusunda trigliserit düzeylerine etkisi	36
Grafik 3.8. Diyetin karaciğerdeki oksidatif stres üzerine etkisi.....	37

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

	Sayfa
Fotoğraf 2.1. Metabolik kafeslerdeki fareler.....	24
Fotoğraf 2.2. Polarografi.....	26
Fotoğraf 3.1. Karaciğerin histolojik kesiti (H&E x200).....	36
Fotoğraf 3.2. İmmunoblotlama öncesi SDS sayfa jeli.....	37



1. GİRİŞ

Obezite, dünya çapında hassas bir yaşta birçok kişiyi etkileyen önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Obezite tedavi edilmezse, bunun etkisi genellikle hipertansiyon, diyabet, kanser, kardiyak miyopati ve dislipidemi gibi diğer hastalıklara ilerlemesidir. Bu nedenle önlenmesi ve tedavisi, daha ileri hastalık komplikasyonlarının önlenmesi için büyük önem taşımaktadır (Oono, Chen, Overvoorde, Kohler ve Theologis 1998). Obezite temel olarak, vücutta dolaşan artan yağ asitleri (FA'lar) ile sonuçlanan yüksek yağ içeren bir diyetin tüketilmesinden kaynaklanır. Bu FA'lar adipoz olmayan dokulara gidecektir, böylece hücre içi yağ asidi ürünlerinin (yani uzun zincirli asetil Koenzim A esterleri, diacylglicerol) ve trigliserin birikimlerini arttıracaklardır (Samuel vd., 2004; Chavez ve Summers, 2003).

Bu lipid metabolitlerinin, hücre içi glikoz oksidasyon işlemi etkileyen oksidatif stresin artmasına ve böylece mitokondri biyogenezini etkileyen reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olan bir dizi metabolik yolu değiştirdiği gösterilmiştir (Sreekumar vd., 2002). Mevcut araştırma, obezite ve diyabet gibi insan metabolik hastalıklarının etkilerini değerlendirmek için, yüksek yağ diyetleri (HFD) gibi kontrollü diyet müdahaleleri kullanarak kemirgenlerde taklit edilebileceğini göstermiştir. Bu diyet modelleri standart bir bileşime sahip değildir ve çalışmanın insan metabolik hastalığı üzerindeki etkisini belirlemek için müdahalenin süresi araştırmacıya aittir (Boudina vd., 2007). Yüksek yağlı diyetler (HFD), doymuş yağ asidi (SFA), tekli doymamış yağ asidi (MUFA) ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) içeren, yağda% 30 ila% 60 enerji içeriği arasındadır. Farklı tip lipidlerin tüketiminin, memelilerin enerji harcaması üzerinde değişken bir etkisi vardır (Buettner vd., 2006).

SFA'lar açısından zengin diyetler bazal oranların azalmasına yol açtığından, ağırlıklı olarak doymamış yağ asitleri içeren diyetlerle karşılaştırıldığında daha yüksek vücut ağırlıkları ve yağ kazancı, diyet yağ içeriği ve yağ asidi doyumluğu, mitokondriyal zarları içerenler de dahil olmak üzere lipid çift katmanlarının yapısını etkiler (Pepe, Tsuchiya, Lakatta ve Hansford, 1999). Diğer sonuçlar, mitokondriyal membran

akışkanlığındaki bozulmaları, taşıyıcıların fonksiyonlarını, kalsiyum dinamiğini, gen ekspresyonunu ve translyasyon sonrası protein modifikasyonlarını içerir (Rohrbach, 2009; Flachs vd., 2002). Bu nedenle mitokondriyal fonksiyon ve ROS üretimi bu nedenle diyetsel yağ alımından etkilenmelidir.

Hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarla ortaya çıkan besin aşırı yükü, çoğunlukla, çoğu zaman, birçok hastalık komplikasyonunun başlamasına neden olan obez bireylerin yaşam tarzına ve çoğunlukla beslenme ve fiziksel hareketsizliğe benzemektedir (Despres ve Lemieux, 2006). Bu fazla enerji, adipoz dokuları kullanma kabiliyetine boğacak ve böylece esterleşmemiş yağ asitlerinin (NEFA'ların) akışını artıracak ve karaciğerde, kasta ve kalpte ektopik yağ birikmesine neden olacak proinflamatuvar sitokinlerin ve adipokinlerin salınımını artıracaktır (Hulbert, Turner, Storlien ve Else, 2005). Akıştaki değişiklikler karaciğerde çok toksiktir çünkü karaciğerde ATP üretimi, oksidatif dengesizlik, insülin direnci ve mitokondriyal disfonksiyon, lipid peroksidasyonu ve NF-kB ve JNK enflamatuvar yolların aktivasyonu sonucu proinflamatuvar sitokinlerin indüksiyonuna neden olur (Donnelly vd., 2009).

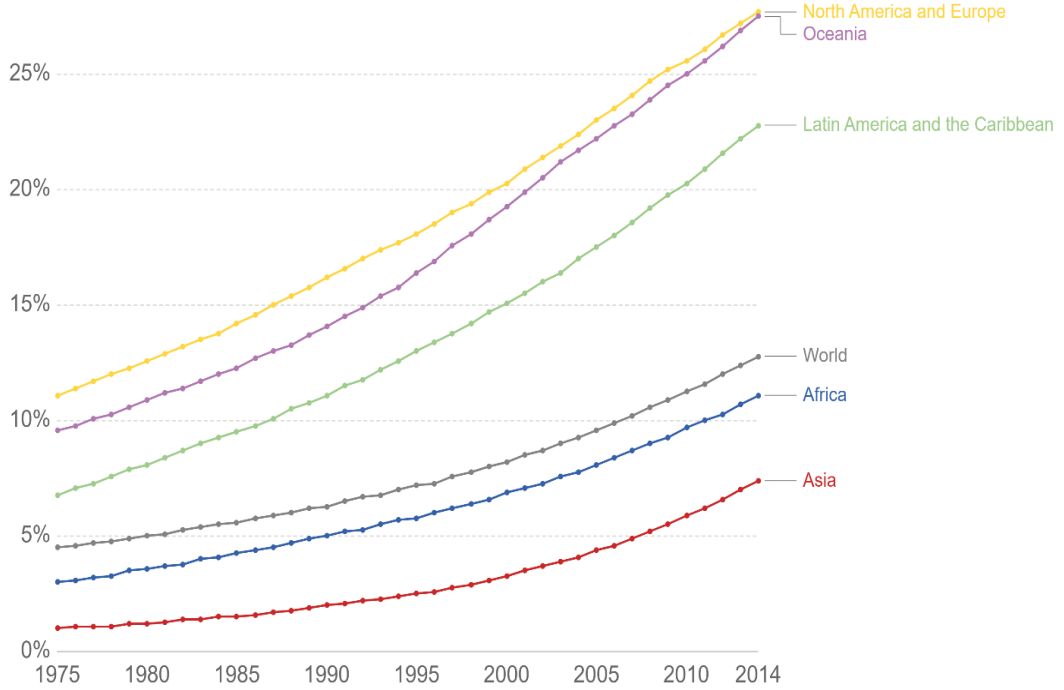
1.1. Obezite

1.1.1. Epidemi

Obezite Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından, vücut ağırlığının (kg) boyunun (m) karesine cinsinden oranı vücut kütle indeksi (VKİ, kg/m^2) bazında tanımlanmaktadır (WHO, 2019). WHO kriterlerine göre, 25'ten büyük veya ona eşit bir VKİ fazla kilolu olarak kabul edilir ve 30'dan büyük veya ona eşit bir VKİ obez olarak kabul edilir. Obezitenin prevalansı, farklı bölgelerde ve etnik kökenlerde önemli ölçüde değişiklik gösterir, ancak çoğu bölgede aynı artış eğilimi gözlemlenebilir. Son 20 yılda, gelişmiş ülkelerde obez insanların oranı çarpıcı bir şekilde artmıştır (Grafik 1.1).

Prevalence of obesity in adults by region

The prevalence of obesity in adults, measured as the percentage of adults aged 18 years and older (both male and female) with a body-mass index (BMI) greater than 30 kilograms per metre squared.



Source: UN Food and Agricultural Organization/WHO

OurWorldInData.org/obesity/ • CC BY-SA

Grafik 1.1. Dünyada obezite prevalansı

1.1.2. Sınıflandırma

Sınıflandırma vücut yağının dağılımına dayanmaktadır ve merkezi obezite ve periferik obezite olan iki tip tanımlanmıştır. Santral obezite, mide ve karın çevresinde aşırı viseral yağ birikimi anlamına gelir. Periferik obezite, özellikle subkutan bölgede aşırı yağ birikmesidir. Periferik tipte kalça ve uyluk bölgelerinde yağ birikir; bu, kalçaların neredeyse yuvarlandığı ve kalçaların normal konulara göre daha büyük görüneceği anlamına gelir.

Obezite, populasyonlar arasındaki boydan bağımsız olarak ağırlıkların karşılaştırılmasını sağlayan vücut kitle indeksi (VKİ) ile belirlenebilir. Mutlak bel çevresi (erkek > 90~94 cm, kadın > 80 cm) veya bel-kalça oranı (ABD’de erkekler için 0,95 ve kadınlar için 0,80) ölçülerek teşhis edilebilir (WHO, 2019). VKİ kullanılarak obezite daha doğru ölçümlerle sağlanabilir. Tablo 1.1 vücut kitle indeksine göre kilo durumunu ve obezitenin değerlendirilmesini göstermektedir.

Tablo 1.1. *VKİ ve bel çevresi ile fazla kilo ve obezitenin sınıflandırılması*

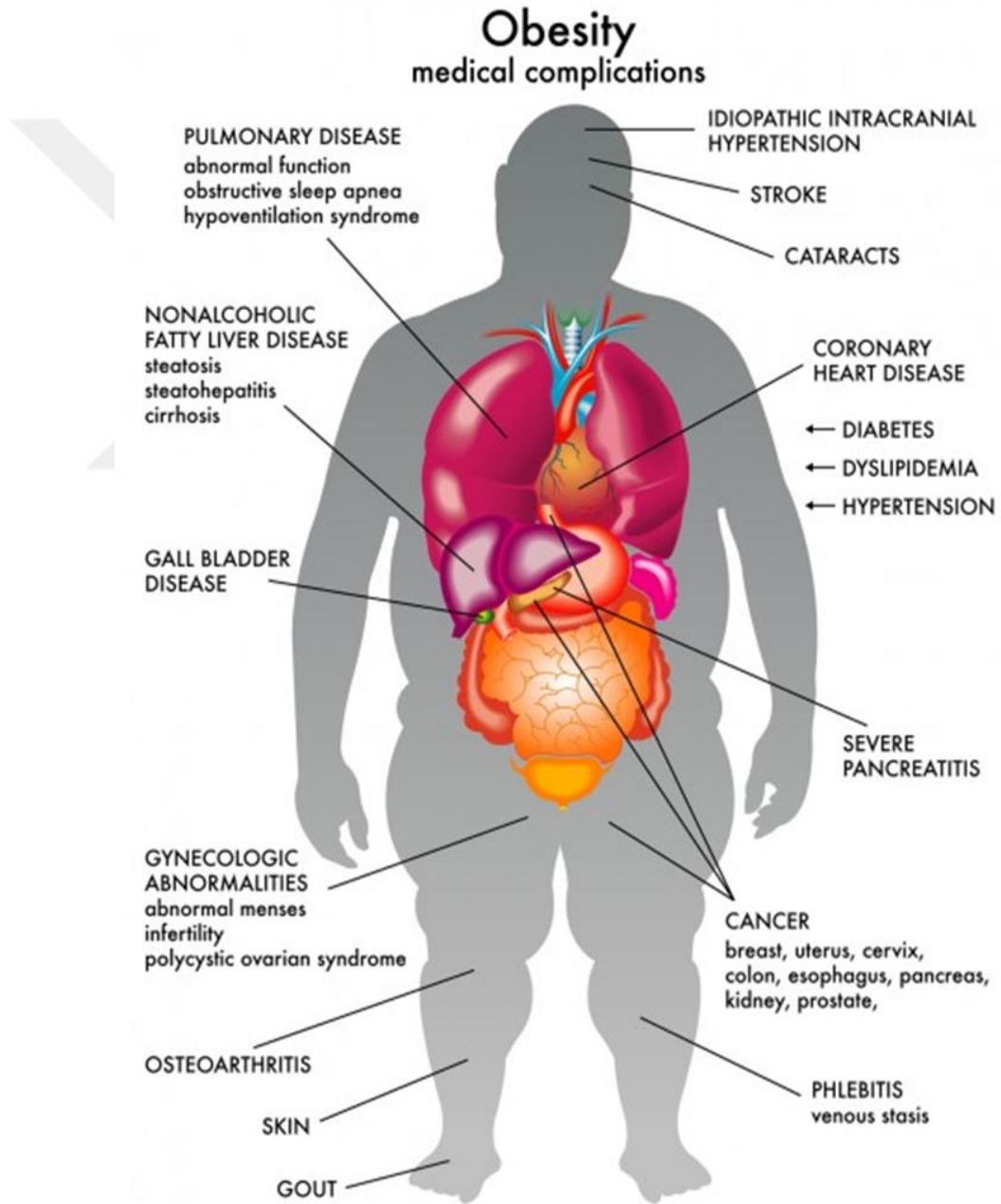
	VKİ (kg/m ²)	Obezite Sınıfı	(Normal Ağırlık ve Bel Çevresine Göre)	
			Erkekler ≤40 inç (≤102 cm) Kadınlar ≤ 35 inç (≤88 cm)	>40 inç (>102 cm)
Düşük	< 18,5			
Normal	18,5-24,9			
Kilolu	25,0-29,9		Artmış	Yüksek
Obezite	30,0-34,9	I	Yüksek	Çok Yüksek
	35,0-39,9	II	Çok Yüksek	Çok Yüksek
Aşırı Obezite	≥ 40	III	Aşırı Yüksek	Aşırı Yüksek

1.1.3. Obezite Komplikasyonları

Tedavi edilmeyen obezite en yaygın tip 2 diyabet (T2D), alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), vasküler komplikasyonlar ve kanser ile birlikte birçok metabolik hastalığa yol açacaktır. T2D, genellikle insülin direnci denilen bir durumla başlayan metabolik bir hastalıktır (Lear, James, Ko ve Kumanyika, 2010). İnsülin direnci, hedef dokuların (karaciğer, kas ve yağ dokusu gibi) insülinin etkisine karşı duyarlılığının azalması veya duyarlılığı olarak tanımlanmaktadır. İnsülin, kan glukoz seviyelerinin, lipid metabolizmasının ve protein sentezinin düzenlenmesi için pankreastaki β-hücreleri tarafından salgılanan bir hormondur (Stumvoll, Goldstein ve van Haeften, 2005). Karaciğerde insülin, glukoneogenezi ve glikojenolizi inhibe ederek, glikoz üretiminin baskılanmasına neden olur. İnsülin ayrıca glikoz alımını uyarır ve yağ dokusunda lipolizi baskılar. Buna göre, bu hormon kan glukoz homeostazında temel bir rol oynar. İnsülin direnci, vücut insüline daha az duyarlı hale geldiğinde oluşur ve bu nedenle normal kan glukoz seviyelerini korumak için artan insülin seviyeleri gerekir. β-hücrelerinden insülin sekresyonu, insülin direncini telafi etmek için yeterli olmadığında, T2D, hiperglisemi ile gösterildiği gibi oluşur.

Aşırı kilonun bir sonucu olarak ortaya çıkan vasküler komplikasyonlar, koroner kalp hastalığı, kardiyomiyopati, periferik vasküler hastalık ve felç gibi kardiyovasküler

hastalıklar olup, dislipidaemi, yüksek tansiyon ve ateroskleroz gibi ortak risk faktörlerini paylaşır. Obez bireylerin sistemlerinde yüksek kolesterol seviyelerine ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) seviyelerine sahip olma eğiliminde olmaları nedeniyle ortaya çıkarlar. Bunlar, kanla taşınamayacak kadar ağır olacağı için arterlerde birikecektir, böylece hipertansiyon ve ateroskleroz gibi bir takım komplikasyonlara yol açabilir. Obezite kaynaklı tıbbi komplikasyonlar Şekil 1.1’de verilmiştir.



Şekil 1.1. Obezite ve ilgili tıbbi komplikasyonlar

1.1.4. Önlem Ve Tedavi

Obezitenin çok yaygın olduğu ve tedavisi ne kadar zor olduğu göz önüne alındığında, önleme özellikle önemlidir. Aşırı kilolu ve şişmanlığı önlemek için, insanlar beslenme gereksinimlerine göre yemek yemeli ve içmeli, düzenli egzersiz yapmalı ve kilolarını düzenli olarak kontrol etmelidir. Yüksek enerji yoğunluğuna sahip ve daha düşük enerji yoğunluğuna sahip yiyecekler tüketilmelidir. Televizyonda ya da internette sıkça oturan ve benzeri aktivitelerde aktif olmayan bir yaşam tarzı, kilo almayı teşvik eder. Günlük aktivitelerde ve boş zaman arayışlarında egzersiz yapmak önleyici bir etkiye sahiptir (Donnelly vd., 2009).

1.2. Karaciğer

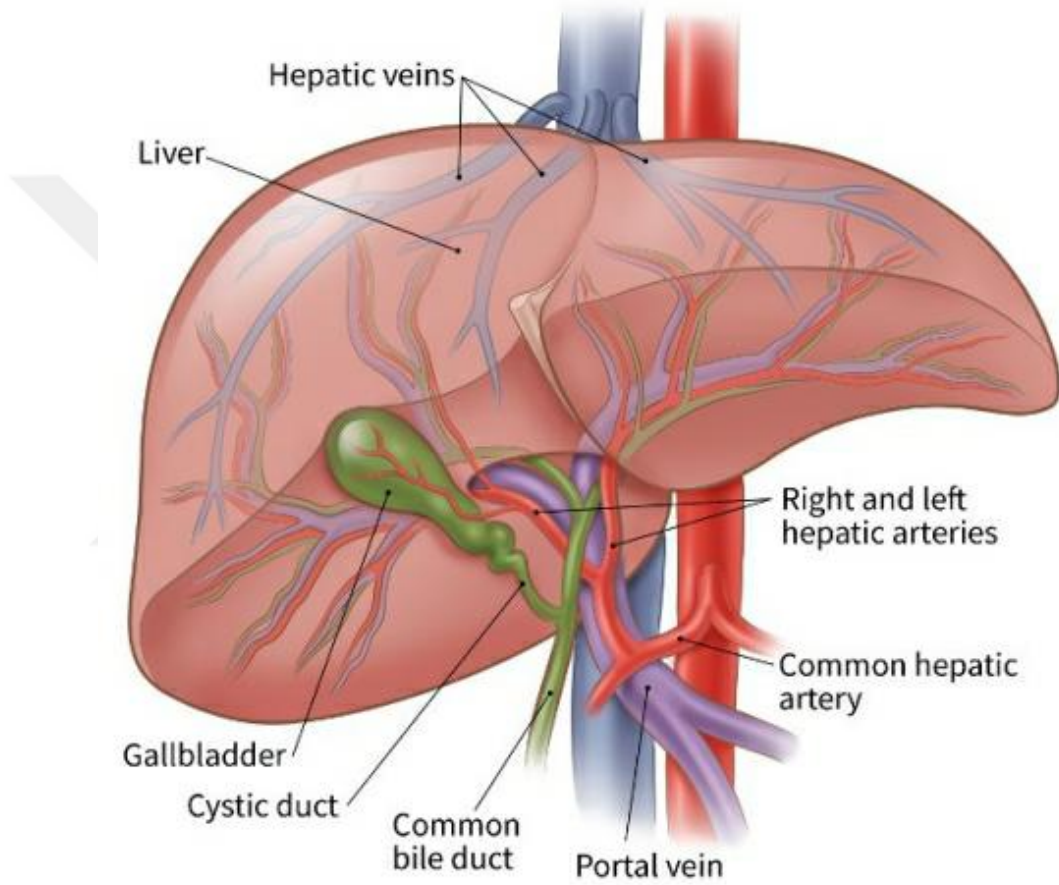
1.2.1. Temel Karaciğer Fizyolojisi

Karaciğer insan vücudundaki en büyük iç organ ve bezdir. Üst karın boşluğunda yer alır ve çok çeşitli hayati fonksiyonlar yerine getirir. Kan plazması, hormonlar ve kolesterol için protein ürettiği, bağışıklık yanıtına katıldığı, glikojen depoladığı, vücut glikozunun ana sağlayıcısı olduğu için “metabolik merkez” olarak adlandırılır ve vücutta taşınması için yağ asitlerini, trigliseritleri ve lipoproteinleri sentezleyebilir. İki ana damar karaciğere kan sağlar; hepatik arter oksijenli kan sağlarken, portal ven dalak ve pankreas da dahil olmak üzere tüm gastrointestinal sistemden boşaltılan mezenterik kan sağlar; Portal venin dalları, hepatik arter tüm karaciğer dokusuna nüfuz eden portal yollar olarak bilinen yapılar oluşturmak için hepatik safra kanalları ile birleşir. De-oksijenli kan, her lobülün merkezi damarına akar. Santral venler hepatik venlere dönüşerek sonunda vena kava inferior olur. Karaciğerin görevlerini yerine getirmesi, zararlı metabolitlerin temizlenmesi ve Şekil 1.2.’de gösterildiği gibi sindirim safrası üretimi için benzersiz vaskülarizasyon gereklidir.

1.2.2. Alkolden Bağımsız Karaciğer Yağlanması

Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), dünya çapında son dönem karaciğer hastalığına ilerleyebilecek en yaygın kronik karaciğer hastalığı nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Patolojik tablo, alkolün kötüye kullanılmamasına rağmen,

alkol kaynaklı karaciğer hastalığına benzer. NAFLD, basit steatozdan steatohepatite, ilerlemiş fibrozis ve hepatik yetmezlik ve hepatoselüler karsinomun doğal komplikasyonları ile siroz gelişimine kadar uzanan bir karaciğer hastalığı spektrumunu içerir. Alkolsüz steatohepatit veya NASH, NAFLD spektrumundaki bir aşamayı temsil eder ve patolojik olarak, nekro-enflamatuar aktivite ile birlikte steatoz varlığı ile tanımlanır.



Şekil 1.2. Karaciğer vaskülarizasyonu

1.3. Mitokondri

1.3.1. Mitokondri Biyoenerjitiği

Mitokondri, bir hücrenin normal işleyişinin, enerji üretiminden sorumlu oldukları için ayrılmaz bir parçasıdır. Evrim boyunca kendi genomlarını korudular ve bu sayede ihtiyaç duydukları proteini, dış fonksiyonundan ödün vermeden doğru şekilde ifade etmelerini sağladılar. Böylece mitokondri, ATP formunda enerji üretmek için

şekerlerin, proteinlerin ve yağların tam oksidasyonunda kullanılan başlıca enzimatik sistemleri barındırır.

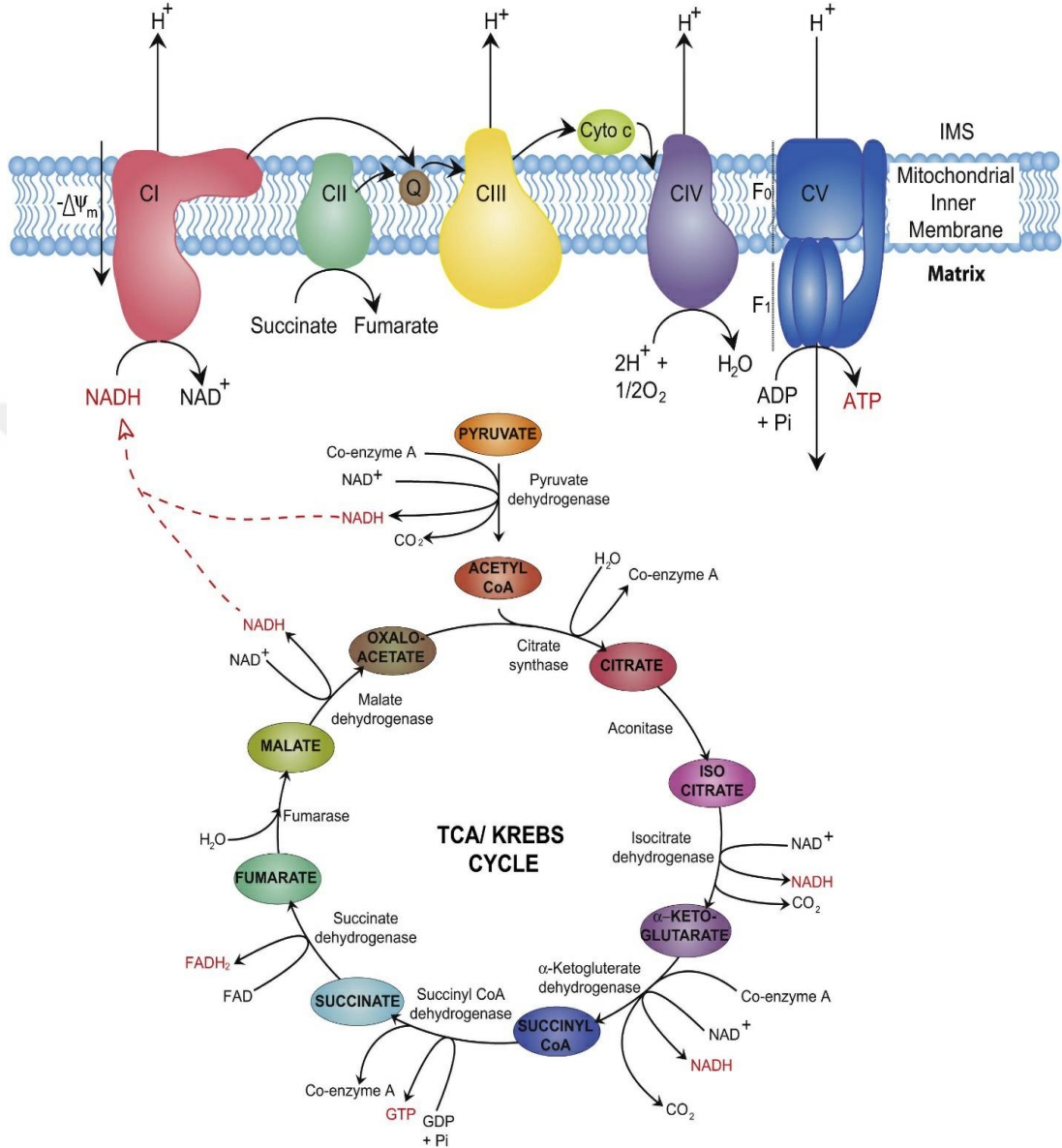
1.3.2. Karbohidratlar Ve TCA Döngüsü İçin Alt-Tabakalar Olarak Yağ Asitleri

Eksojen glukoz, glikoz taşıyıcıları vasıtasıyla sitosol içine taşındıktan sonra, fosforile edilir ve glikojen olarak depolanabilir veya glikoz-6-fosfata (G6P) dönüştürülebilir. G6P, esas olarak glikolitik yolağa girer; glikoliz işlemi, bir glikoz molekülünü iki piruvat molekülüne dönüştürürken, aynı anda indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotidi (NADH) ve az miktarda ATP üretir (Donnelly vd., 2009). Piruvat ya sitozol içindeki laktat dehidrojenaz (LDH) yoluyla laktata dönüştürülebilir veya piruvat dehidrojenazın (PDH) oksitleneceği ve dekarboksilat piruvatın asetil-CoA'ya oksitleneceği mitokondriyal matrikse taşınabilir. Asetil-CoA'dan iki karbonlu asetil grubu daha sonra sitrat sentaz yoluyla sitrat oluşturmak için oksaloasetata geçer ve böylece TCA döngüsü başlar (Cappellini ve Fiorelli, 2008; Williamson ve Cooper, 1980).

FA'lar ayrıca TCA döngüsüne asetil-CoA yoluyla da girebilir. Serbest FA'lar, sitosol içindeki lipoliz yoluyla salındığında, bu FA'lar, dış mitokondriyal zardaki karnitin palmitoiltransferaz (CPT) I yoluyla yağ acyl karnitine dönüştürülen yağlı acyl-koenzim A (CoA) 'ya esterlenebilir. CPT II, acyl karnitini mitokondriyal matrikse aktarıldıktan sonra tekrar yağ acyl-CoA'ya dönüştürür ve yağ acyl-CoA daha sonra beta oksidasyon yoluna girebilir (Ferne, Trethewey, Krotzky ve Willmitzer, 2004). Asetil-CoA, NADH ve flavin adenin dinükleotidi hidrokinon formunda (FADH₂) bu işlem sırasında üretilir; NADH ve FADH₂, ETS'ye indirgeme eşdeğerleri olarak girerken, asetil-CoA, sitrat oluşturmak için oksaloasetat ile birleştirilerek tekrar TCA döngüsü için bir başlangıç alt-tabakası olarak hizmet eder (Cappellini ve Fiorelli, 2008; Williamson ve Cooper, 1980).

Piruvat, TCA/Çurbs döngüsü enzimleri tarafından katalize edilerek NADH, GTP ve FADH₂ yüksek enerjili moleküllere dönüştürülür. Üretilen NADH, kompleks I'e yerleştirilir ve NAD⁺ sürüş oksidatif fosforilasyonuna dönüştürülür. Elektronların zincir boyunca transferi, proton pompalama yoluyla IMS'ye membran potansiyelini

korur. Bu son adımda ADP, kompleks V (ATP sentaz) yoluyla ATP oluşturmak üzere fosforile edilir.



Şekil 1.3. Elektron taşıma zincirinin biyoenerjetiği ve TCA veya Krebs döngüsü

1.3.3. TCA Döngüsü Ve Oluşturulan İndirgeyici Eşdeğerler

TCA döngüsünün birincil amacı piruvat ve amino asitlerin oksidasyonu yoluyla CO_2 ve guanosin trifosfatın (GTP) yanı sıra NADH ve FADH_2 gibi indirgen eşdeğerler üretmektir; Birkaç kimyasal reaksiyondan üretilen bu indirgeyici eşdeğerler sonuçta ETS'ye güç verir ve ATP üretimine neden olur. Taşıyıcı proteinler, substratları mitokondriyal matris içine taşır, bu sayede TCA döngüsüne oksitlenecek çeşitli

aşamalarda girebilirler (Drynan, Quant ve Zammit, 1996). Piruvat, sitrat, 2-okso-glutaratın oksidasyonu ve tüm besleme elektronlarını, NAD + 'nin NADH'ye indirgenmesiyle ETS'nin Kompleksi I içerisine gönderir (Şekil 1.2); Mitokondriyal matris içindeki yağ acyl-CoA'nın beta-oksidasyonu ayrıca daha sonra Kompleks I'e beslenen NADH'yi de üretir. Süksinatın oksidasyonu ETS'nin elektronlarını Kompleks I yerine Kompleks II'ye beslemesiyle benzersizdir; bu reaksiyon, FAD + 'ın FADH₂'ye indirgenmesiyle oluşur. Yağ acyl-CoA'nın beta-oksidasyonu ayrıca elektron transfer proteinine (ETF) elektronlar sağlayabilen FADH₂'yi üretir. Buna ek olarak, gliserol-3-fosfatın (G3P), iç mitokondriyal zar içindeki G3P-dehidrojenaz yoluyla dihidroksiaseton fosfata (DHAP) dönüştürülmesi, ETS'ye elektron bağışlamak için başka bir kaynak olarak FADH₂ üretebilir (Cappellini ve Fiorelli, 2008; Williamson ve Cooper, 1980).

1.3.4. Elektron Taşıma Sistemi

Şekil 1.2'de gösterildiği gibi, elektronların ETS'ye girdiği mitokondri içinde dört konum vardır: G3PDH, Kompleks I, Kompleks II ve ETF (Kibbey, Pongratz, Romanelli, Wollheim, Cline ve Shulman, 2007). Dört bölgedeki elektronlar en sonunda taşıyıcı ubikinonu (Koenzim Q) ubikinol'e (QH₂) düşürmeye yarar. Bu azalma, Karmaşık I'de bir flavin mononükleotidi (FMN) vasıtasıyla aynı anda meydana gelir, dört proton, matristen intermembran boşluğa translokasyon yapar ve proton gradyanı oluşturur. Ubiquinolden gelen elektronlar daha sonra ubiquinol-sitokrom c oksidoredüktazdan oluşan Karmaşık III'e aktarılır; iki elektron sitokrom c'ye yönlendirilirken diğer iki elektron ubikinonun kinonunu kinol'e indirger (Chance, ve Williams, 1955). Elektronlar, mobil elektron taşıyıcı sitokrom c vasıtasıyla sitokrom c oksidazdan oluşan Kompleks IV içine akmaya devam eder. Bu elektronlar moleküler oksijene transfer edilir ve ardından iki su molekülü üretir. Protonların, yukarıda bahsedilen komplekslerin her birinde matristen intermembran boşluğa pompalanması, ATPase (Kompleks V) yoluyla ATP üretmek için gerekli olan proton gradyanını üretir; bu işlem, elektronların ETS'den akması ile gerçekleşir (Chance, ve Williams, 1955). (Kompleks II, süksinat dehidrojenaz yoluyla kinona elektron vermesine rağmen, proton gradyanına katkıda bulunmaz).

Kalp, kas ve karaciğer gibi dokulardan bağlanmış mitokondride, Kompleks V, metabolik substratlardan çıkartılan elektronların akışı tarafından üretilen proton gradyanı vasıtasıyla ATP üretmek üzere ADP'yi fosforile eder (yani, ATP'nin üretimi, ETS boyunca elektronların akışıyla bağlanır). Sonuç olarak oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) olarak bilinen işlemde su oluşturmak için Kompleks IV'te oksijen ve H⁺'yi azaltır.

Bu dokulardaki mitokondriyal solunum esas olarak birleşmiş olsa da, OXPHOS, glikoliz, FA oksidasyonu ve enerji kaynakları olarak TCA döngüsüne dayanma derecesi kalp, kas ve karaciğer arasında değişiklik gösterir. Örneğin, normal koşullar altında, kalpte üretilen ATP'nin çoğunluğu, karbohidrat ve lipid substratların bir karışımı kullanılarak mitokondriyal OXPHOS yoluyla yapılır, ancak, hızlı bir durumda, FA'ların beta-oksidasyonu, elektronların ana kaynağıdır (Scheffler, 2007). Tip I iskelet kası (yani, mitokondriyal örneklerimizin hepsinin izole edildiği kas türü), OXPHOS yine ana enerji kaynağı olarak işlev görürken, Tip II iskelet kası çoğunlukla glikolize dayanır. Karaciğerde, amino asitlerden indirgenmiş alfa-ketoasitler, özellikle asetoasetatı asetil-CoA'ya dönüştürmek için gereken enzim bu dokuda bulunmadığından, önemli bir enerji kaynağıdır (Opie, 2004).

1.3.5. Oksidatif Stress

Oksidatif stres reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından indüklenir ve NAFLD'nin ilerlemesine katkıda bulunabilecek başka bir faktör olduğu öne sürülmüştür. [26]. Başlıca hücrel ROS tipleri süperoksit ($\bullet\text{O}_2^-$), hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asittir (HOCl) (Berg, Tymoczko ve Stryer, 2002). Artan ROS seviyeleri, protein, lipid ve DNA gibi hücrel bileşenlerle reaksiyona girerek hücre hasarına neden olacak şekilde toksik etkilere neden olabilir. ROS üç ana yoldan üretilir: mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, peroksizom ve enzimatik kaynak (Sumida, Niki, Naito ve Yoshikawa, 2013).

Oksidatif fosforilasyonun bir yan ürünü olarak, elektron taşıma zincirinden elektron sızıntısı nedeniyle mitokondride süperoksit üretilir (Mittal, Siddiqui, Tran, Reddy ve Malik, 2014) (Şekil 1.4). Elektronlar, enerji salınımının eşlik ettiği redoks

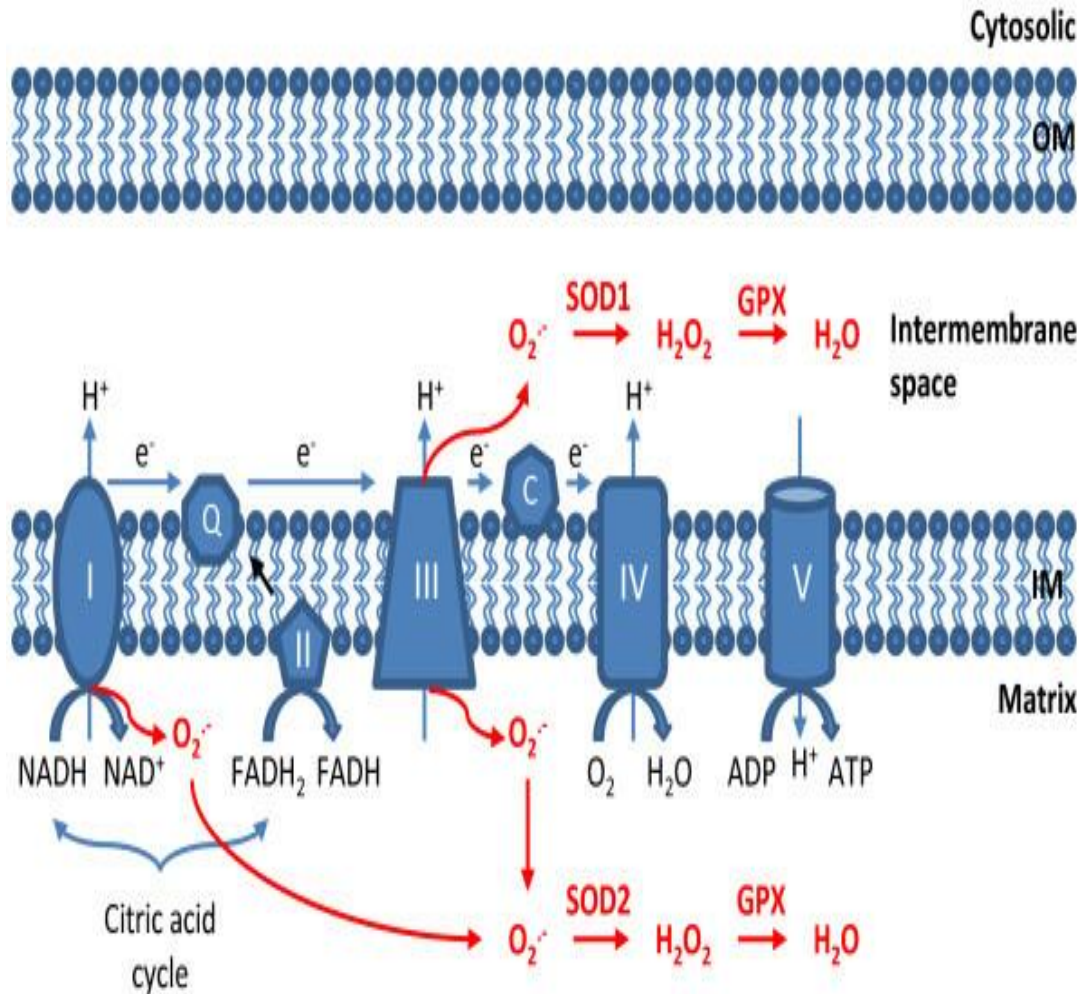
reaksiyonları ile protein kompleksleri (I-V) boyunca taşınır. Enerji, protonları matristen intermembran boşluğa pompalamak için kullanılır, bu da iç sınır zarında elektriksel bir potansiyel oluşturur. Protonlar gradyan boyunca tekrar matrise geri akar, bu da ADP'den ATP üretmek için ATP sentazını aktive eder. Bu süreçte elektronların kompleks I ve kompleks III'ten sızabilir, bu da O_2 'nin $\bullet O_2^-$ 'e düşmesine neden olur. Superoksit dismutaz (SOD), hücrelerin bu ROS tarafından indüklenen yaralanmaya karşı korunması için glutatyon peroksidaz (GPx) ile H_2O 'ya indirgenebilen $\bullet O_2^-$ 'i oluşturan H_2O_2 'nin dismutasyonunu katalize eder (Mittal vd., 2014). H_2O_2 , iltihaplı bölgelerde miyeloperoksidaz yoluyla yüksek oranda reaktif HOCl'ye veya hipoksi sırasında Fenton'ın tepkimesi ile yüksek derecede toksik $\bullet OH$ 'ye dönüştürülebilir (Sumida vd., 2013).

Ek olarak, plazma membranında peroksizomda veya NADPH oksidazda ROS üretilebilir (Li, Fang, Mai, Choi, Wang ve Yang, 2013). Peroksizom transfer elektronlarındaki çeşitli oksidazlar, H_2O_2 ve az miktarda süperoksit üretimi için diğer metabolitlerden O_2 'ye transfer olur. ROS, peroksizomdaki oksidatif homeostazı korumak için katalaz ve manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) gibi peroksizomal redüktazlarla bozunabilir. NADPH oksidaz, bir diğer büyük süperoksit kaynağı olan süperoksit üretmek için elektronu NADPH'den O_2 'ye alan, membran bağlı bir protein kompleksidir (Schrader ve Fahimi, 2006).

Klinik çalışmalar, NASH'in ferritin seviyelerindeki artış ve eşlik eden azalmış glutatyon seviyeleri ile birlikte lipid peroksidasyonu gösterildiği gibi karaciğerdeki oksidatif stres ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Bedard ve Krause, 2007). Lipid kaynaklı oksidatif stresin altında yatan mekanizmalar ile ilgili olarak birkaç çalışma, lipid birikiminin NADPH oksidaz ekspresyonunu arttırdığını, ancak SOD ve GPx gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonunu azalttığını göstermektedir (Malaguarnera, Madeddu, Palio, Arena ve Malaguarnera, 2005; Furukawa, Fujita, Shimabukuro, Iwaki, Yamada, Nakajima, Nakayama, Makishima, Matsuda ve Shimomura, 2004). Sırayla oksidatif stres, lipid birikimini şiddetlendirebilir ve lipid peroksidasyonunu ve NASH'a ilerlemesini destekleyen diğer oksidatif hasarı indükleyebilir (Carmiel-Haggai, Cederbaum ve Nieto, 2005; Sekiya, Hiraishi, Touyama ve Sakamoto, 2008; Thuyle vd., 2015). Oksidatif stresin azaltılmasının sadece ROS kaynaklı hücre hasarını

azaltmakla kalmayıp aynı zamanda hepatik steatozu iyileştirebileceği de öne sürülmüştür.

Elektronlar, mitokondrinin iç zarında bulunan komplekslerin (I-IV), enerji salınımının eşlik ettiği redoks reaksiyonları ile taşınır (kahverengi oklarla gösterilmiştir). Üretilen enerji, protonları matristen intermembran boşluğa pompalamak için kullanılır, bu da iç sınır zarında elektrik potansiyeli oluşturur. Protonlar gradyan boyunca tekrar matrise geri akar, bu da ADP'den ATP üretmek için kompleks V'yi (ATP sentaz olarak da bilinir) aktive eder. Elektronların kompleks I ve kompleks III'ten sızması, O_2 'nin $\bullet O_2^{-1}$ 'e düşmesine neden olur. Süperoksit dismutaz (SOD), H_2O_2 'yi biçimlendiren ve daha sonra glutatyon peroksidaz (GPx) ile H_2O 'ya indirgenebilen $\bullet O_2^{-1}$ 'in değişimini katalize eder.



Şekil 1.4. Mitokondride oksidatif fosforilasyon

1.4. Obezite Gelişiminde Diyet

1.4.1. Diyetin Obezitenin Başlangıcındaki Rolü

Daha önce belirtildiği gibi, şişmanlık, üç ana kaynaktan karbonhidrat, yağ ve protein kaynaklı enerji alımının artmasından kaynaklanmaktadır. Bu makro besinler farklı enerji yoğunluklarına sahiptir ve sitokinlerin doygunluğu ve salıverilmesinde farklı etkiler gösterir. Bu nedenle obezitenin gelişimini etkileyecek kalorileri artıracaktır. Bu tezde, düşük protein tüketiminin ve aşırı karbonhidrat tüketiminin de obezitenin başlamasına katkıda bulunduğunu takdir ettiğimiz için doymuş ve doymamış yağların oynadığı rol üzerinde durulmuştur.

1.4.2. Doymuş Yağ Asitleri

Doymuş yağ asitleri hem hayvansal hem de bitkisel yağlardan elde edilir. Zengin diyet doymuş yağ asitleri kaynakları arasında tereyağı yağı, et yağı ve tropik yağlar (hurma yağı, hindistancevizi yağı ve hurma çekirdeği yağı) bulunur. Doymuş yağ asitleri, eşit sayıda karbon atomuna sahip düz zincirli organik asitlerdir. 8 ve 16 arası karbon atomuna sahip tüm doymuş yağ asitleri, diyetlerinde kullanıldığı zaman serum LDL kolesterol konsantrasyonunu yükseltir. Diyetlerin çoğunda baskın doymuş yağ asidi, palmitik asittir (C16:0); serum kolesterol konsantrasyonlarına göre 'nötr' kabul edilen cis-mono doymamış yağ asitleri, özellikle oleik asit (C18: cis1 n-9) ile karşılaştırıldığında kolesterolü yükseltir. Başka bir deyişle, oleik asit çoğu araştırmacı tarafından serum kolesterolü veya lipoproteinler üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı düşünülmektedir.

1.4.3. Doymamış Yağ Asitleri

Doymamış yağ asitleri, karbon zincirinde bir veya daha fazla çift/üçlü karbon-karbon bağı içerir. Bu temelde üç sınıfa ayrılabilirler:

- *Tekli doymamış yağ asitleri (MUFA):* Farklı pozisyonlarda meydana gelebilecek yalnızca bir çift bağ olması durumu. En yaygın monoenler 16-22 zincir uzunluğuna ve cis konfigürasyonuna sahip çift bağa sahiptir. Bu, çift

bağın her iki tarafındaki hidrojen atomlarının aynı yönde yönlendirildiği anlamına gelir.

- *Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)*: En az iki çift bağ varsa ve genellikle o karbondan üçüncü ve dördüncü karbon atomu arasında bulunursa bunlara ω -3 yağ asitleri denir. İlk çift bağ altıncı ve yedinci karbon atomu arasındaysa, o zaman ω -6 yağ asitleri olarak adlandırılır. PUFA'lardaki çift bağlar, bir metilen grubu ile birbirlerinden ayrılır.
- *Asetilenik yağ asitleri*: bir veya daha fazla üçlü bağ olması durumu.

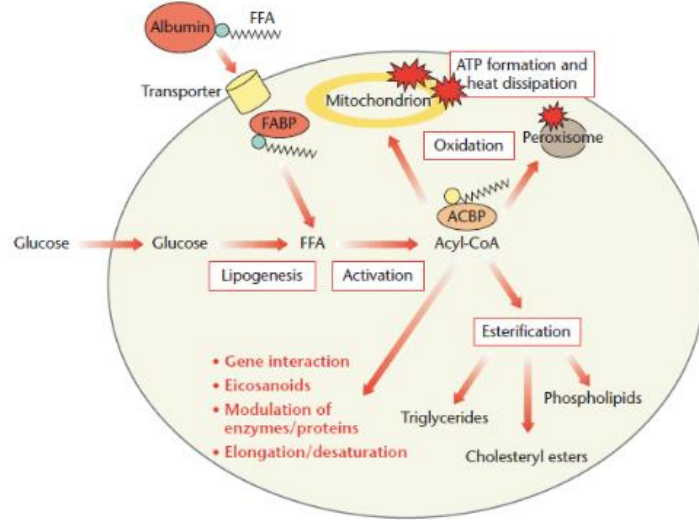
1.4.4. Yağ Asitlerinin Metabolizması

Serbest yağ asitleri (FFA) ve monoacylgliceroller ince bağırsakta serbest bırakılır ve emilir. Bağırsak mukozası hücrelerinde FFA, lizomik damarlar vasıtasıyla, dolaşımdaki bir kolilomikron parçası olarak taşınan triacylglicerollere tekrar esterlenir. Dolaşımda, yağ asitleri albümine bağlı olarak veya lipoproteinlerin bir parçası olarak taşınır. FFA, temel olarak plazma zarındaki protein taşıyıcıları tarafından hücrelere alınır ve hücre içi olarak yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABP) ile taşınır (Şekil 1.5).

Daha sonra FFA, acyl-CoA bağlayıcı protein (ACBP) ile mitokondri veya peroksizomlara b-oksidasyon için (ısı ve ATP olarak enerji oluşumu) veya farklı lipid sınıflarına esterifikasyon için endoplazmik retikulum içine alınmadan önce aktive edilir (acyl-CoA). Acyl-CoA veya bazı FFA, gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerine bağlanabilir veya sinyal moleküllerine (eikosanoidler) dönüştürülebilir. Glikoz, hücrelerde bir glikoz / enerji fazlası varsa, yağ asitlerine (lipogenezis) dönüştürülebilir.

Serbest yağ asitleri (FFA), çoğunlukla plazma zarındaki protein taşıyıcıları tarafından hücrelere alınır ve hücre içi olarak yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABP) ile taşınır. FFA, acyl-CoA bağlayıcı protein (ACBP) vasıtasıyla mitokondri veya peroksizomlara b-oksidasyona (ATP ve ısı olarak enerji oluşumu) veya farklı lipid sınıflarına esterifikasyon için endoplazmik retikuluma yerleştirilmeden önce aktive edilir (acyl-CoA). . Acyl-CoA veya bazı FFA, gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon

faktörlerine bağlanabilir veya sinyal moleküllerine (eikosanoidler) dönüştürülebilir. Glikoz, hücrelerde bir glikoz / enerji fazlası varsa, yağ asitlerine dönüştürülebilir.



Şekil 1.5. Yağ asitlerinin metabolizması

1.5. Genel Değerlendirme ve Amaç

İnsanlarda, yağdan elde edilen diyet enerjisi miktarı ile fazla kilolu nüfusun oranı (epidemiyolojik çalışmalarda) arasında ve diyetel yağ seviyesi ile vücut ağırlığı artışı arasındaki klinik çalışmaların yanı sıra diyetel yağdaki azalma ve kilo verme arasındaki klinik çalışmalarda anlamlı bir olumlu ilişki bulunmuştur (George, Tremblay, Despres, Leblanc ve Bouchard, 1990; Popkin vd., 1993; Tucker ve Kano, 1992). Bu bağlantılar hayvan çalışmalarıyla da gösterilmiştir (Boozer, Schoenbach ve Atkinson, 1995; Ghibaudi, Cook, Farley, van Heek ve Hwa, 2002; Bourgeois, Alexiu ve Lemonnier, 1983; Takahashi, Ikemoto ve Ezaki, 1999; DeLany, Windhauser, Champagne ve Bray, 2000). İnsanlarda veya daha fazla obeziteye yol açan daha fazla diyet yağına sahip hayvan modellerinde bu ilişki, diyetin yağ içeriğinin enerji dengesinde önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Genel olarak, yağ olarak toplam enerjinin% 30'undan fazlasını içeren diyetler obezitenin gelişmesine yol açar.

Birçok araştırmacı, diyetin yağ asidi kompozisyonunun vücut ağırlığı düzenlenmesinde ve yağ dokusunun hücreselitesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (yağ hücresi hacmi ve sayısı). İnsan deneklerde yapılan çalışmalar, SFA'nın PUFA'dan daha

obezojenik olduğunu göstermiştir (Kien, Bunn ve Ugrasbul, 2005; Piers, Walker, Stoney, Soares ve O’Dea, 2003; Silva, Guimaraes, Mizurini, Maia, Ortiz-Costa, Sardinha ve do Carmo, 2006). Bu fikir, SFA’da orta ya da zengin diyetlerle beslenmede daha fazla vücut yağ birikimi (Takeuchi, Matsuo, Tokuyama, Shimomura ve Suzuki, 1995; Bell, Spencer ve Sherriff, 1997) veya daha yüksek vücut ağırlığı (Wang, Storlien ve Huang, 2002; Ellis, Lake ve Hoover-Plow, 2002) göstererek hayvan çalışmaları ile desteklenmiştir. Ellis vd., (2002) tarafından yapılan 3 haftalık dişi Sprague-Dawley cinsi sıçanlar, düşük SFA mısır yağı veya yüksek SFA hindistancevizi yağı bakımından zengin diyetleri (toplam enerjinin% 40’ı) 8 hafta boyunca karşılaştıran bir çalışmada, hindistancevizi yağı ile beslenen hayvanlarda yüksek yağ hücresi sayısı ve mısır yağı ile beslenen sıçanlarda daha büyük yağ hücresi büyüklüğü bulunmuştur. Adipositlerin hipertrofisi, hiperplazi için bir önkoşul olduğundan, bu sonuçlar SFA’da yüksek bir diyetle beslenmekten daha şiddetli bir obezite formunun geliştiğini göstermektedir.

Bazı raporlar, yüksek yağlı diyetlerin neden olduğu yüksek gıda verimliliğine (tüketilen kJ gıda başına g vücut ağırlığı artışı) bağlı olan obeziteyi ilişkilendirmiştir. Yağ kaynaklı enerji, vücut ağırlığı artışı üzerinde yağsız kaynaklardan elde edilen enerjiden daha büyük bir etkiye sahiptir (Hill, Melanson veWyatt, 2000; Bray ve Popkin, 1998; Prpic vd., 2002; Roberts, Berger. ve Barnard, 2002; O’Rahilly ve Farooqi, 2008). Diyet kaynaklı termogenez, besinlerin sindirilmesi, emilmesi ve depolanması için enerjidir ve vücut için yağlar için %2-3, proteinler için %25-30 ve karbonhidratlar için %6-8 olan bir enerji kaybı oluşturur. Bu nedenle, besin kullanımının etkinliği makro besinler arasında farklılık gösterir ve yağlar %97-98 arasında bir verime sahiptir, oysa verimlilik proteinler için %70-75 ve karbonhidratlar için %92-94’tür (Silva vd., 2006). Ek olarak, glikoz veya amino asitlerden uzun zincirli yağ asitleri oluşturmak enerji tüketirken, diyet yağı önceden oluşturulmuş uzun zincirli yağ asidi içerir.

Yüksek yağ diyetinin katkısının yanı sıra, araştırmacılar obezite gelişiminin de genetik ve çevresel faktörler arasındaki etkileşimin sonucundan kaynaklanabileceğini göstermiştir. Genetik faktörlerin obezite gelişimindeki anahtar rolü, ikizlerde ve insanlarda evlat edinme çalışmalarında zarif bir şekilde gösterilmiştir (Stunkard, Foch

ve Hrubec, 1986; Stunkard, Harris, Pedersen ve McClearn, 1990; Maes, Neale ve Eaves, 1997; Cui, Kong ve Zhang, 2012). Bir çalışmada 1974 monozigotik (MZ) ve 2097 diziyotik (DZ) erkek ikiz çiftleri karşılaştırılmış ve MZ ikizlerinde aşırı kilolu uyum oranının DZ ikizlerinin iki katı olduğu bulundu (Stunkard vd., 1990). Bir başka çalışma, VKİ'nin kalıtılabilirliğinin birbirinden bağımsız 93 çift ikizde hesaplandığını, birlikte yetiştirilen ikizlerdeki benzer olduğunu ve ayrıca genetik faktörlerin obezite üzerindeki önemli etkilerini gösterdiğini göstermiştir (Maes ver ark., 1997). Bu ikiz ve evlat edinme çalışmalarından elde edilen sonuçlar, 25.000 ikiz çift, 50.000 biyolojik ve evlat edinen aile üyesini içeren sistematik bir derlemede özetlendi ve yeniden değerlendirildi (Cui vd., 2012). Bu verilere dayanarak, BKİ'nin ortalama korelasyonunun MZ ikizleri için 0,74, DZ ikizleri için 0,32, kardeşler için 0,25, ebeveyn ve yavru çiftler için 0,19, evlat edinen akrabalar için 0,06 ve eşler için 0,12 olduğu tahmin edildi. Yukarıdaki bu çalışmalar, genetik faktörlerin obezite gelişimindeki önemini ortaya koymaktadır.

Oksidatif stres, NASH'in patogenezinde katkıda bulunabilecek diğer faktörlerle de (mitokondriyal disfonksiyon, insülin direnci, ER stresi ve enflamasyonu gibi) ilişkilendirilmiştir. Mitokondri, ROS üretimi için ana bölgedir ve ROS'a bu kadar yakın olmasından dolayı oksidatif stresin birincil hedefi oldukları düşünülmektedir (Trachootham, Lu, Ogasawara, Nilsa ve Huang, 2008). Ayrıca, mtDNA'nın oksidatif hasara duyarlı olduğu öne sürülmüştür (Park vd., 2009). İnsanlarda yapılan çalışmalar ayrıca oksidatif stresin insülin direnci ile ilişkili olduğunu ve diyabetik komplikasyonların başlıca bir nedeni olduğunu göstermiştir (Ceriello, 2003). Deney hayvanları ve hücrelerinde, farmakolojik bir ajan veya MnSOD eksikliği (MnSOD +/-) tarafından indüklenen mitokondriyal süperoksit üretimindeki artış insülin sinyal iletimini etkiler. MnSOD transgenik fareleri diyete bağlı insülin direncinden korunmaktadır. Bu, insülin etkisinin mitokondri tarafından üretilen ROS tarafından düzenlenebileceğini ve mitokondrinin diyabetle ilişkili oksidatif stresde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. İnsülin direncine ek olarak, ROS ER stresini tetikleyebilir ve pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olan NFκB'yi aktive edebilir (Ceriello, 2003).

Mitokondri enerji metabolizmasında merkezi bir rol oynar. Yağ dokusundan taşınan veya lipoliz ve DNL'den üretilen FA'ler ATP oluşturmak için to-oksidasyon, sitrik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon yoluyla metabolize edilir. Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu hem kemirgenlerde (Hoehn vd., 2009) hem de insanlarda (Rector vd., 2010). NASH ile bağdaştırılmıştır. Örneğin, NASH'in bir genetik obezite sıçan modelinde (Otsuka Long-Evans Tokushima yağlı sıçanlar) azalmış CPT1 aktivitesi gibi bozulmuş mitokondriyal fonksiyondan kaynaklandığı öne sürülmüştür. İnsanlarda, NASH hastalarında mitokondri yapısal değişikliklerinin hepatik steatoz hastalarından farklı olduğu gösterilmiştir (Hoehn vd., 2009). Bu, obez hastalarda mitokondriyal solunumun arttığını ancak obezitenin NASH ile ilişkili olduğu zaman azaldığını gösteren bir rapor ile tutarlıdır (Rector vd., 2010), mitokondriyal disfonksiyonun NASH'in bir özelliği olabileceğini düşündürmektedir.

Diyetsel yağ, protein ve karbonhidratla karşılaştırıldığında en fazla enerji yoğun olduğu için (Koliaki vd., 2015), yağ bakımından zengin bir diyetin tüketilmesinin, enerji alımındaki bir artış nedeniyle şişmanlığa neden olma olasılığı daha yüksektir (Paddon-Jones vd., 2008). Bu, HF diyetlerinin tüketiminin aşırı kilo almak için bağımsız bir risk faktörü olduğunu gösteren epidemiyolojik çalışmalarla desteklenir (Lawton, Burley, Wales ve Blundell, 1993), ancak metabolik etkiler yağın FA kompozisyonunun tipine bağlı olarak değişebilir. Trans-yağ asitlerin alkolsüz yağlı karaciğer gelişimindeki rolünü belirlemek için kantitatif çalışmalar yapılmıştır. Trans-yağ asitleri tüketmek insülin direnci ve kardiyovasküler hastalıklar gelişme riskini artırır. Suriye sıçanları üzerinde yapılan bir çalışmada, bir gruba PUFA, diğer gruba trans-yağ asitleri verildi (Roberts vd., 2002). Trans-yağ asitleri alan bir grup bozulmuş glukoz toleransı geliştirmiştir. Ayrıca, bu sıçanlarda insülin direnci oranı artmıştır. Bir çalışmada, Batı yaşam tarzının Suriye sıçanları üzerindeki etkisi test edildi. Karaciğer steatoz oranı, fruktozdan zengin içeceklerle ilişkili trans-yağ asitler alan sıçanlarda anlamlı olarak artmıştır (Ghibaudi vd., 2002). Bu nedenle, trans-yağ asitlerin rolü, alkolsüz yağlı karaciğerin ilerleyişinde değerlendirilmelidir.

Domuz yağı ve don yağı gibi hayvansal yağlardan elde edilen doymuş uzun zincirli (C16:0, C18:0 ve C20:0) FA bakımından zengin HF diyetlerinin, şişmanlık, insülin direnci ve kemirgenlerde diğer metabolik işlev bozukluklarına neden olduğu ortaya

konulmuştur (Bray ve Popkin, 1998; Prpic vd., 2002; Stunkard vd., 1990). Farklı yağ tiplerinin (SFA'lar veya doymamış FA'ler) metabolize edildiklerinde benzer miktarda enerji sağladığı ve doyma üzerindeki etkilerinde çok az fark olduğu öne sürülmüştür (Astrup, 2001; Zock, 2006). SFA'lar ayrıca, muhtemelen mitokondriyal solunumdaki SFA kaynaklı kompensatör artışından dolayı karaciğer hücrelerinde ROS üretimini artırarak oksidatif strese neden olabilir (Alfenas ve Mattes, 2003; Nakamura vd., 2009). Ayrıca, SFA'ların kas ve pankreas hücrelerinde mtDNA'ya zarar verebileceği, oksidatif strese ve apoptoziye yol açabileceği gösterilmiştir (Egnatchik, Leamy, Noguchi, Shiota ve Young, 2014; Yuzefovych, Solodushko, Wilson ve Rachek, 2012).

Oleik asit, diyet içindeki MUFA'nın ana kaynağı olarak tüketilir. Zeytinyağı en önemli oleik asit kaynağıdır (diğer kaynaklar avokado ve tohumlardır). MUFA, kan lipid endekslerini düşürür ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ile toplam kolesterolün yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) oranına indirgenir. Bir meta-analiz çalışmasında, çeşitli diyetlerin lipid ve glisemik endeksler üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bu metaanalizin sonucu, tekli doymamış yağ asitlerinden zengin diyetlerin, TG konsantrasyonunu ve kan kolesterolünü sırasıyla %19 ve %22 oranında azalttığını göstermiştir. Ayrıca HDL oranını artırır ancak LDL'yi etkilemez (Grishko, Rachek, Musiyenko, Ledoux. ve Wilson, 2005).

Bir çalışmada, farelere mono-doymamış yağ asitleri ile ilişkili metionin ve kolin eksikliği (MCD) diyeti (kolin ve metionin eksikliği) verildi. Zeytinyağının, karaciğerde TG konsantrasyon oranını, sadece MCD diyeti alan diğer farelere kıyasla% 30'a kadar düşürdüğünü gösterdiler. Böylece zeytinyağının insülin direnci ve TG'nin hepatik salgılanması oranını arttırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle zeytinyağı, periferik organlardan karaciğere TG akışının akışını azaltır (Degirolamo ve Rudel, 2010; Hussein vd., 2007). Dengeli beslenme ile ilişkili zeytinyağı alan sıçanlarda hepatosteatoz oranı artmıştır (Hernandez vd., 2005). Çoklu doymamış yağın aksine, zeytinyağı hepatik fibrozisin ilerlemesini önler (Szende, Timar ve Hargitai, 1994). Ancak, alkolsüz yağlı karaciğer hastalarının sağlıklı insanlardan daha az zeytinyağı veya MUFA alıp almadıkları gösterilmemiştir. MUFA'nın alkolik olmayan yağlı karaciğerin gelişmesinde veya geliştirilmesindeki rolü tam olarak anlaşılmamıştır.

Yu vd., (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada, çeşitli FA içeriği ve doygunluğu ile beslenen farelerin karaciğerinin ve kalbin lipid bileşimi üzerindeki yağ asidi doygunluğunu belirlemek istenilmiştir. HF ile beslenen farelerdeki karaciğer mitokondrisinde solunum ve ATP üretiminin tüm ADP seviyelerinde ve elde edilen kelepçe clamp karaciğer mitokondrisinde kontrollere kıyasla anlamlı derecede azaldığını bulunmuştur. Bununla birlikte, sadece 12 hafta boyunca kontrol ve HF ile beslenen ayrı farelerin çalışmalarında mitokondriyal biyoenerjetikte hiçbir değişiklik gözlemlenmediğini bildirmiş, ancak bir HF diyetini yeterli bir süre boyunca beslemenin mitokondriyal biyoenerjetik bozduğunu ve böylece kontrollere kıyasla daha yüksek bir ROS ATP üretim maliyeti ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Buna ek olarak, Lionetti vd., (2014) tarafından yapılan başka bir araştırmada, yüksek yağlı bir diyetle indüklenen hepatik steatozda mevcut olan mitokondri disfonksiyonunun, mitokondriyal dinamik ve morfolojideki değişikliklerle ilişkili olup olmadığı değerlendirilmiştir. Balık yağının, yağ asitlerinin kullanımını uyararak, obeziteye ve anti-steatotik etkilere sahip olabileceği öne sürüldüğü için, yüksek balık yağı diyetlerine kıyasla yüksek domuz yağı olan yüksek yağ diyeti kullanılmıştır. Yüksek domuz yağı içeren beslenmenin daha büyük hepatik lipid birikimi, ilişkili mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile insülin direnci, daha yüksek oksidatif stres ve mitokondriyal fisyon işlemlerine kayma gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Mitokondriyal füzyon işlemleriyle ilişkili olarak anti-steatotik etkiye sahip olan yüksek balık yağı beslemesine kıyasla). Bu nedenle, farklı yüksek yağlı diyet türleri mitokondriyal fonksiyon ve dinamik davranış üzerindeki etkileriyle farklılık gösterir ve aşırı beslenmeye farklı hücre adaptasyonlarına neden olur.

Mitokondriyal oksidatif dengesizliğin NAFLD ve ilgili metabolik hastalıkların gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Cardoso vd., (2013), uzun zincirli yağ asidi metabolizmasına bağlı olarak diyete duyarlı bir hidrojen peroksit üretim kaynağını, çok uzun zincirli açıl CoA dehidrogenaz (VLCAD) tarafından katalize edilen ilk pirojeno-CoA dehidrojenasyonu, mitokondriyal oksidasyonda önemli bir elektron sızıntısı adımı olarak tanımlanmıştır. Gerçekten de, çoğu HFD modeli mitokondriyal hidrojen peroksit üretiminin artmasına, oksidatif hasar belirteçlerinin görülme sıklığının artmasına (örneğin arttırılmış lipid oksidasyonu, karbonlanmış proteinler, 3-

nitrotirosin seviyeleri ve azaltılmış akonit aktivitesi) ve HFD hayvanlarında oksidatif dengesizliğin meydana geldiğine işaret eden düşük antioksidan savunmalara neden olur.

Tüm bu veriler ışığında bu çalışmada; yağ asidi diyetinin karaciğerde mitokondri üzerine bioenerjetik etkileri incelenmeye çalışılmıştır.



2. MATERYAL VE METOD

2.1. Deney Hayvanı

Deneysel çalışmalarda C57BL/6 erkek fareler kullanılmış ve bunlar, yiyecek ve suya serbest erişimi olan 12 saatlik bir aydınlık / karanlık döngüsünde $22 \pm 1^\circ\text{C}$ de tutulmuştur. Zenginleştirme için kafese fare çarkı konulmuştur. Deney düşük gürültülü, sıcaklığın takip edildiği ve nemin %50'de tutulduğu bir düşük stres ortamında gerçekleştirilmiştir. Üniversitedeki hayvan tesisinde 1-2 haftalık iklimlendirme sonrasında, standart bir yem diyeti ile (CH diyeti, Specialty Feeds, Avustralya) serbest yemleme yapılmıştır. Her bir fare için gıda alım hızı (diyet tartılarak) ve vücut ağırlığı haftada iki kez ölçülmüştür.

2.2. Diyetler

On iki haftalıkken, 4-5 fareden oluşan gruplar 5 tedavi diyetinden birine rastgele olarak seçilmiştir. Protokol 1'de fareler %19 protein %73 karbonhidrat ve %8 lipitten oluşan normal kemirgen diyetine devam edilmiş ve bu grup kontrol grubunu oluşturmuş olup, hayvanlar 12 hafta sonra sakrifiye edilmiştir. Kontrol grubu dahil, üç farklı deneysel diyetle ise rejimlerin ikisinde ise, fareler 14 hafta boyunca HF ile beslenmiştir. HF diyetlerden birinde % 50 yağlı ve n-3 bakımından zengin yağ asitlerine sahip menhaden yağı (MO) kullanılmıştır (MO diyeti, n-3 PUFA, D10122003, Araştırma Diyetleri, New Brunswick, NJ.). Ev yapımı bir diyet protokolüne göre işleyen diğer HF diyeti ise; kurabiye, sığır karaciğeri ezmesi, sucuk, çikolata ve Türk hamur işlerinden oluşturulmuş ve standart bir diyet haline getirilmiştir. Ev yapımı diyetin enerji bileşimi %12,7 protein, %32,8 karbonhidrat ve %54,5 lipid olarak belirlenmiştir.

2.3. Yem Alımının Değerlendirilmesi

Yem alımının değerlendirilebilmesi için fareler, Fotoğraf 2.1'de verildiği şekilde metabolik kafeslere yerleştirilmiştir. Bütün gıda bileşenleri, sunulan bütün bileşenlerin en azından bir kısmının ertesi günü geri kalmasını sağlamak için birkaç küçük parça halinde ve fazla miktarda konulmuştur. Her hayvan tarafından tüketilen her bir

bileşenin miktarı, sunulan miktar ile ertesi gün geri kalan miktar arasındaki farktan hesaplanmıştır.



Fotoğraf 2.1. Metabolik kafeslerdeki fareler

2.4. Dolaylı Kalorimetre

Oksijen tüketimi (VO_2) ve karbondioksit üretimi (VCO_2), diyet uygulaması sonunda açık devre respirometre (akış hızı 1 L/dk) ile ölçülmüştür. Ölçümler, ışık fazının ikinci saati boyunca $22^{\circ}C$ 'de gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar, kalorimetrik odalara yerleştirilip ve 2 saat boyunca ısınmasına izin verilmiştir. Veri kayıtları, yaklaşık 30 dakikalık bir süreç içerisinde, 90 saniyelik periyotlar halinde her bir kafes içinde ardışık olarak yapılmıştır. Hem VO_2 hem de VCO_2 vücut yüzeyi için ayarlanmıştır ($mL\ dk^{-1} \times kg\ 0.75$) ve toplama periyodu süresince ortalaması alınmıştır (Ferne vd., 2004). Solunum kısmı ($RQ = CO_2\ üretimi / O_2\ tüketimi$) dolaylı kalorimetri verilerinden hesaplanmıştır.

Oksijen tüketimi denklemi:

$$VO_{2.subject} = V_iO_{2i} - V_oO_{2o} \quad (2.1)$$

Karbondioksit üretimi denklemi:

$$VCO_{2.subject} = V_oCO_{2o} - V_iCO_{2i} \quad (2.2)$$

2.5. Numune Toplama

On iki haftanın sonunda kontrol grubundaki fareler gece boyunca 12 saat aç bırakılmış ve 0,1 mL/80 g vücut ağırlığında bir dozda Zoletil: Rompun (4:1) ile uyuşturulmuştur. Deneme yemleri ile beslenen gruplardaki fareler 14 hafta sonra sakrifiye edilmiştir. Karaciğer farelerden disekte edilip, hemen tartılmıştır. Karaciğerin küçük bir bölümü kullanılmak üzere disekte edilip, geri kalanı daha sonra kullanılmak üzere sıvı azotta dondurulmuş ve bir sonraki analize kadar -70°C de saklanmıştır. Alınan karaciğer dokuları histolojik analiz için, buzda soğutulmuş tampon (pH 7,4, 250 mmol/L sukroz, 10 mmol/L Tris-HCl ve 1 mmol/L EDTA) ve palmitat oksidasyonu ölçümü için, %10 nötr tamponlu formalin (Sigma-Aldrich, #HT501128) içerisine konulmuştur.

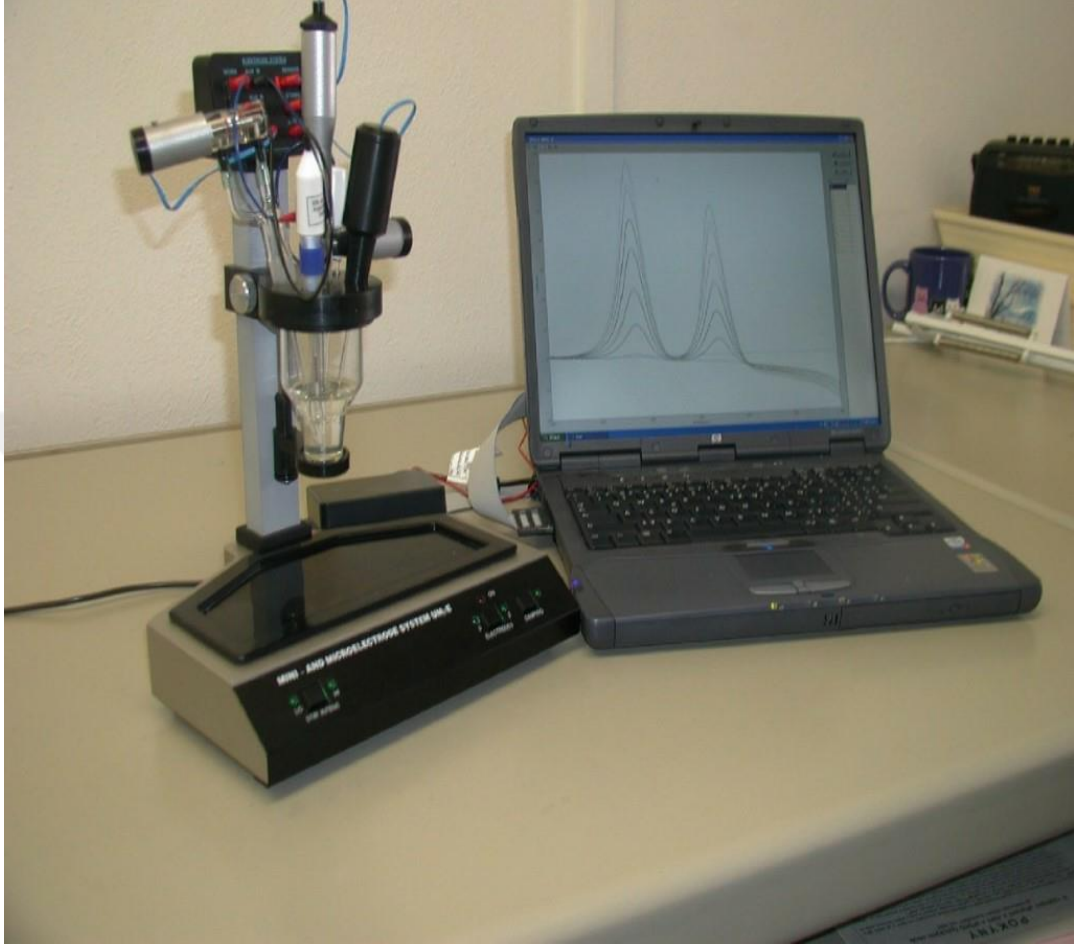
2.6. Karaciğerden Mitokondri İzolasyonu

Mitokondri izolasyonu için, taze karaciğer (3g), bir teflon/cam homojenleştirici ile 35 mL soğuk izolasyon tamponunda (250 mM sukroz, 5 mM Tris HCl, 2 mM EGTA, pH 7,4) homojenleştirilmiştir. Çekirdekler ve hücre parçaları, 10 dakika boyunca 500 g'de santrifüjlenerek çıkartılmıştır. Süpernatant, mitokondriyal peleti çöktürmek için 8,000 g'de santrifüjlenmiştir. Pelet bir kez resüspansiyonla yıkayıp 8,000 g'de santrifüjlenmiş ve nihai pelet aynı tampon içinde yeniden süspansiyon haline getirilmiştir. Mitokondriyal protein Bradford metodu ile ölçülmüştür (Yuzefovych vd., 2012).

2.7. Mitokondri Solunum Hızı

Mitokondriyal oksijen tüketimi, Egnatchik vd., (2014) metodu üzerinde modifikasyonlar yapılarak Fotoğraf 2.2'de gösterildiği gibi polarografik olarak ölçülmüştür. İzole edilmiş mitokondri (2,5 mg protein/mL), su ile termostatik olarak düzenlenmiş bir odada, bilgisayar kontrollü bir Clark tipi oksijen elektrotu Oxygraph (Hansatech, Norfolk, UK) ile bir solunum tamponu içinde (145 mM KCl, 30 mM HEPES, 5 mM KH₂P₀₄, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA ve %0,1 BSA, pH 7,4 37°C de), 1,8 mg mitokondriyal protein/mL konsantrasyonunda inkübe edilmiştir. Süksinat (10 mM), 500 µm ADP'nin yokluğunda (durum 4) ve varlığında (durum 3) substrat olarak kullanılmıştır. Mitokondriyal işlevsellik, solunum kontrol oranı (RCR = durum 3

VO₂/durum 4 VO₂) ile kontrol edildi ve RCR'ı 2,50'den düşük örnekler kullanılmamıştır.



Fotoğraf 2.2. Polarografi

2.8. Mitokondri Hidrojenperoksit Üretimi

Mitokondriyal H₂O₂ salınımı, Amplex™ red/horseradish peroksidaz yöntemi (Molecular Probes, Eugene, OR) ile ölçülmüştür. Red/horseradish peroksidazı (HRP, 2 birim/mL) floresan olmayan Amplex kırmızısının (80 µM) H₂O₂ bağımlı oksidasyonunu, floresan resorufin kırmızıya katalize etmektedir. HRP membranlardan geçemeyen büyük bir protein olduğundan dolayı, bu deney yalnızca mitokondriden salınan H₂O₂'yi saptamaktadır (mitokondri içerisindeki H₂O₂'yi hesaplayamaz). 200 birim/mL CuZn-SOD, bütün O₂'yi, H₂O₂'ye dönüştürmek üzere eklenmiştir. O₂ HRP ve HRP bileşik I ile çok hızlı tepkimeye girdiğinden ve asıl H₂O₂ üretim oranının yetersiz değerlendirilmesiyle sonuçlanmıştır. Floresans, 545 nm'lik bir uyarma dalga boyunda ve 590 nm'lik bir emisyon dalga boyunda bir Floroskan Ascent tipi 374 çok

oyuklu plaka okuyucu (Labsystems, Helsinki, Finlandiya) kullanılarak izlenmiştir. Floresanstaki artışın eğimi, standart bir eğri ile H₂O₂ üretim oranına dönüştürülmüştür. 450 birim/mL katalaz ilavesi, bu eğimi ~%99 azaltmıştır (veriler gösterilmemiştir). Bütün deneyleri siyah 96 oyuklu plakalarda, 30°C de gerçekleştirilmiştir. Kullanılan substratlar, 9 mM süksinat ve 5 mM glutamat + malat idi. Her bir deneyde, Amplex kırmızının zemin oksidasyon oranlarını ve substrat olmadan (durum 1) mitokondrideki H₂O₂ salınım oranlarını tahmin edebilmek için, bir tepkime oyuğunda yalnızca tampon kullanılırken, bir diğerinde mitokondri içeren tampon kullanılmıştır. Reaksiyon tamponu 125 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 2 mM K₂HPC₄, pH 7,44'ten oluşturulmuştur. Bu araştırmada, Amplex kırmızı H₂O₂ deneyini ayrıca, dışarıdan eklenen SOD'nin (Schrader ve Fahimi, 2006; Bedard ve Krause, 2007; Malaguarnera vd., 2005) varlığında ve yokluğunda H₂O₂ üretimini ölçerek O₂ üretimi oranını hesaplamakta kullanılmıştır. Bu yaklaşımın bir zayıflığı, süperoksit üretiminin aşırı hesaplanmasıdır, çünkü süperoksit, HRP'yi hem düşürebilir hem de okside edebilir. Önceki prosedürün bu sorununu çözmek için, bir süperoksit “çanak” görevi görmek üzere (HRP yerine) Amplex kırmızı reaksiyon tamponuna 20 µM asetillenmiş sitokrom c (cyt c) eklenmiştir. Bu şekilde, SOD'nin yokluğunda, ilave mitokondriyal salınmış süperoksit asetillenmiş cyt c'yi (H₂O₂ oluşturmayan bir tepkime) azaltır. SOD eklendiğinde, ilave mitokondriyal süperoksit SOD ile tepkimeye girer ve H₂O₂ ortaya çıkarır. Bu nedenle, SOD ilavesi üzerine H₂O₂ oluşumu, net ilave mitokondriyal süperoksit salınımını tahmin etmekte kullanılabilir.

2.9. Trigliserit (TG) Düzeylerinin Ölçümü

Karaciğerdeki trigliseritler, diyet yağının etkisini değerlendirmek için ölçülmüştür. Numuneler, bir cam homojenleştirici kullanılarak bir kloroform ve metanol (2:1) karışımı içinde homojenleştirilmiş ve gece boyunca çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. Sulu fazı çıkarmak için % 0,6 NaCl eklenmiştir. Karışım 1,000 g'de 10 dakika santrifüjlenip, düşük organik faz yeni tüplere aktarılmıştır. Daha sonra ekstrakt kurutulmuştur ve TG konsantrasyonunun ölçülmesinden önce, yeniden etanol içinde çözülmüştür. TG seviyeleri Trigliserit GPO-PAP (Roche Diagnostics, #11730711216) kiti kullanılarak belirlenmiştir.

2.10. Western Blotlama

Doku örnekleri, 10µL/mL proteaz inhibitör kokteyli (Sigma-Aldrich, # 9599), 10µL/mL fosfataz inhibitör kokteyli (Sigma-Aldrich, #P5726), 10 mM NaF (Sigma-Aldrich, #S7920), 1 mM Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich, # 450243) ve 1 mM fenilmetansülfonil florit (Sigma-Aldrich, # 8830) içeren soğuk RIPA tamponunda bir havaneli karıştırıcı ile homojenleştirildi. Doku lizatları daha sonra 4°C de 15 dakika boyunca 20,000 x g hızında santrifüjlenmiştir. Süpernatandaki protein konsantrasyonları, bisinonik asit tahlili (Sigma-Aldrich, # B9643) ile belirlenmiştir. Protein numuneleri daha sonra suyla seyreltilmiş ve 2,5 µg/µL'lik bir nihai konsantrasyon yapmak için 4 x Laemli tamponu ile karıştırılmıştır. Son olarak, numuneler proteini denatüre etmek için 95°C de 5 dakika kaynatılmıştır.

2.11. SDS-PAGE Ve İmmünoblotlama

Poliakrilamid jeller % 8, 10, 12 veya 14 konsantrasyonunda, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için kullanılmış ve daha sonra çalışan bir tampon içine yerleştirilmiştir. Denatüre protein örnekleri (50 µg/well) ve standart protein merdivenleri (5 µL/well, Bio-Rad, # 161-0374) jelle yüklenmiştir ve ilgilenilen proteinin alt ve üstündeki protein merdivenleri iyice ayrılana kadar, 120V'da dağıtılmıştır. Daha sonra jeldeki proteinler, 100V'da 2 saat boyunca bir transfer tamponu içerisinde PVDF zarına (Bio-Rad, # 162-0177) aktarılmıştır. PVDF zarı, spesifik olmayan bağlanmayı bloke etmek için oda sıcaklığında %3 BSA'da (TBST tamponu, Sigma-Aldrich, #A9418) 1 saat boyunca inkübe edilmiş ve daha sonra da primer antikor ile 4°C de gece boyunca inkübe edilmiştir. TBST içinde 1 saat yıkandıktan sonra, zar, yaban turpu peroksidaz konjugat sekonder antikorunda (Santa Cruz, tavşan için # sc-2004, fare için # sc-2005) inkübe edilmiş ve ardından TBST içinde 1 saat daha yıkanmıştır. Tespit için geliştirilmiş kemilüminesant (Perkin Elmer, # NEL113001EA) kullanılmıştır. Birincil antikor olarak; IRE1, fosfo-IRE1 (S724), CHOP, Grp78, AMPK, Fosfor-AMPK, ACC, Fosfor-ACC, SIRT1 ve OXPHOS kompleksleri kullanılmıştır. % 1 BSA, % 0,02 sodyum azid (Sigma-Aldrich, # 71289) ve % 0,0025 fenol kırmızısı (Sigma-Aldrich, #32661) içeren bir TBST tamponu

kullanılarak, hücre sinyali ve Abcam'dan gelen antikorlar 1:1000, Santa Cruz'dan gelen antikorlar 1:500 oranında seyreltilmiştir.

2.12. İstatistiksel Analizler

Mitokondrial işaretçilere ve inflamatuvar işaretçilere ilişkin veriler, bütün gruplar arasındaki değişiklikleri gözlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edilmiştir. Student Newman Keuls post hoc testi uygun olan yerlerde karşılaştırma yapmak için kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık, $p < 0,05$ 'lik bir alfa değeri ile belirlenmiş ve veriler ortalama (\pm SEM) olarak sunulmuştur.



3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Diyetin Vücut Ağırlığına Etkisi

Aynı vücut ağırlıkları ile başlanan deneyde; birer hafta aralıklarla sakrifiye edilen kontrol ve deneme diyet grupları arasında ağırlık artışı bakımından önemli bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Bu durum farelerin kontrollü bir diyetle beslenmesinin vücut yağ dokusu birikimini etkilemediğini göstermiştir.

Bununla birlikte, kontrol grubuyla yapılan yüksek yağlı diyetlerden alınan kilo artışı önemli ölçüde farklı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Dolayısıyla bu, bize yüksek bir yağ diyetinin farelerin vücut ağırlığını etkilediğini göstermektedir. HDF-1 karışımı ile HDF-2 MO arasında vücut ağırlıkları açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Farelerin ağırlık artışları Tablo 3.1’de verilmiştir. Karaciğer ağırlıkları ölçülen farelerde bu bakımdan önemli bir fark olmamasına rağmen ($p>0,05$), HFD-2 ile beslenenler için ortalama ağırlık, MO’nin yağ dokusu yağlarını azalttığını düşündüren daha düşük bir ağırlığa sahip olduğu tespit edilmiştir.

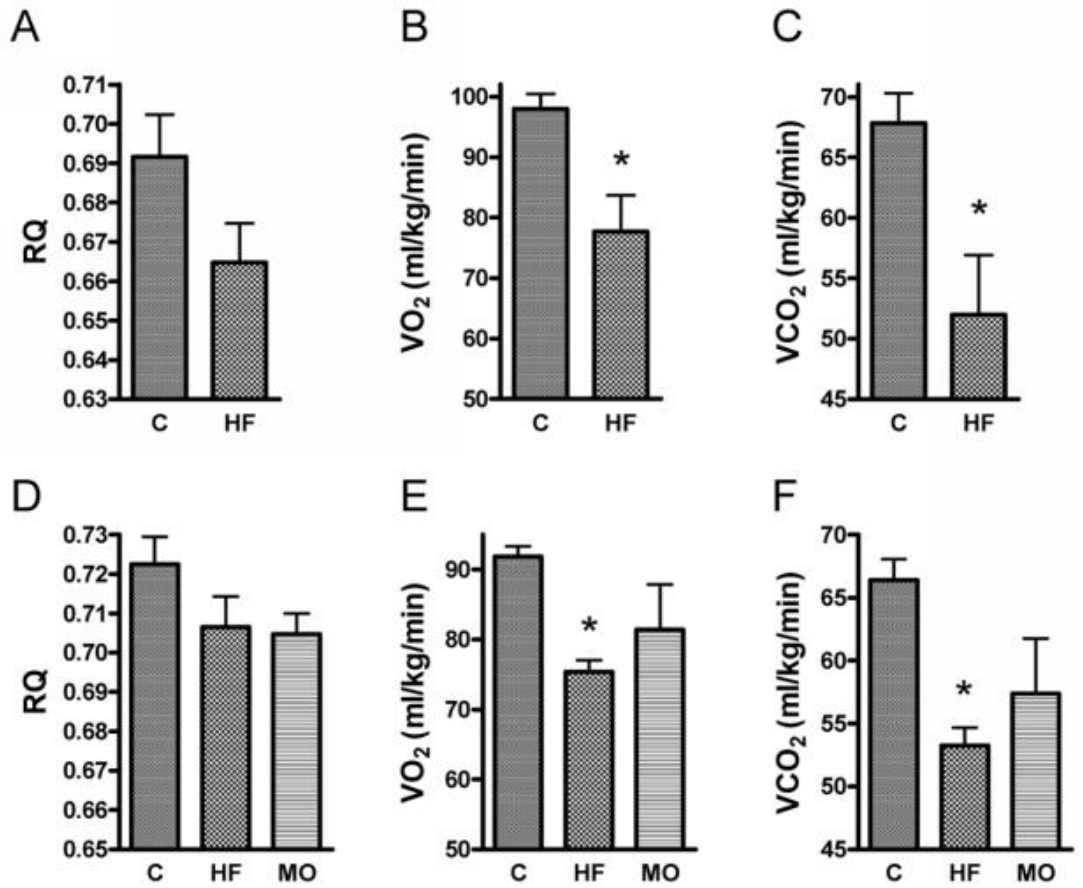
Tablo 3.1. Farklı diyetlerin ağırlık bakımından etkisi

Diyetler	İlk Ağırlık	Son Ağırlık	Ağırlık Artışı	Besin Tüketimi	Karaciğer Ağırlığı
Kontrol (12 h)	28,4±0,5	28,4±0,6	29,5±0,6	29,8±0,7	28,4±0,5
Kontrol	528,9±0,7	529,4±0,6	637,4±1,1	635,4±0,7	528,9±0,7
HDF-1 (karışım)	500,4±0,5	501,0±0,2	607,75±0,7	606,25±0,6	500,4±0,5
HDF-2 (MO)	73,2±6,2	73,8±5,1	65,5±3,1	66,3±4,2	73,2±6,2

3.2. Diyetin Vücut Solunumuna Etkisi

Diyetin metabolik sistem üzerindeki etkisini değerlendirmek için tüketilen O_2 (VO_2) ve üretilen CO_2 (VCO_2) miktarı belirlendi ve sonuçlar normal diyet ile ve HF ile beslenen fareler arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Grafik 3.1). Hem HF hem de MO grupları, kontrol farelerine kıyasla, glikoza göre daha fazla yağ oksidasyonu ile tutarlı olarak daha düşük bir solunum katsayısına (VCO_2/VO_2) sahip olma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu veriler bize HF’nin

mitokondriyal biyoenerjitiği bozduğunu söylerken, menhaden yağında bulunan n-3 yağ asitleri doymuş yağ yerine kullanıldığında faydalar sunabileceğini düşündürmektedir. HF ile beslenen farelerde, kontrollere kıyasla bütün vücut oksijen tüketimi azalmıştır. HF karışımı MO'lu HF'den daha düşük bir enerji harcaması eğiliminde olduğu görülmüştür. Bu, mitokondriyal biyoenerjitiği ve dolayısıyla düşük solunum potansiyelini engellediği gösterilen karışım ile doymuş yağ asitlerinin bir sonucu olabilir. Dolayısıyla bu, diğer araştırmacılar tarafından n-3 yağ asitlerinin, gelişmiş bir metabolik sistem sunduğu sebebiyle daha iyi bir yağ seçimi olduğu verilerini desteklemektedir.

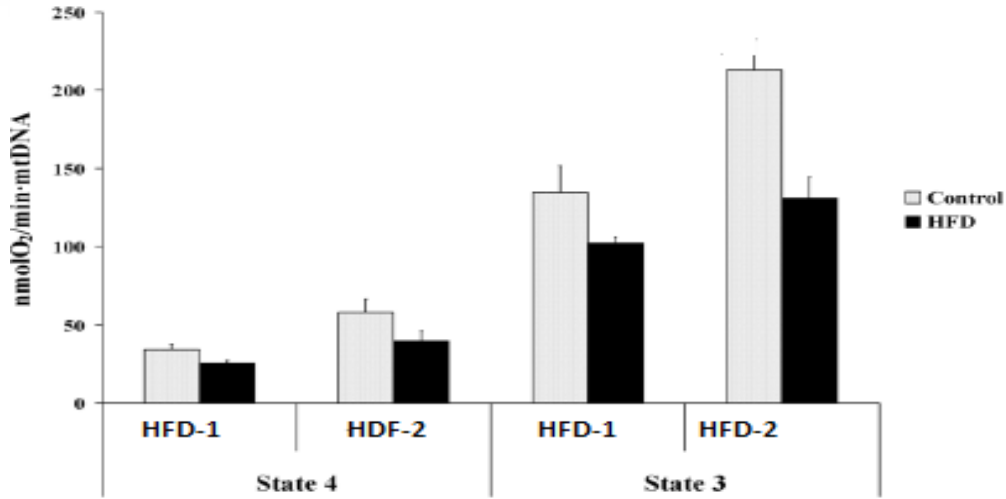


Grafik 3.1. Kontrol (C), yüksek yağ (HF-karışımı) veya menhaden yağlı (MO) HF ile beslenen farelerde bütün vücut solunum parametreleri*

*Solunum bölümü (RQ), VO₂ ve VCO₂ protokol I çalışmaları (sırasıyla 12 hafta, paneller A, B ve C) ve protokol II çalışmaları (sırasıyla 14 hafta, panel D, E ve F) için gösterilmiştir. Veriler ortalama ± SE olarak sunulmuştur, *Eşleştirilmemiş, iki kuyruklu t testi veya Newman-Keuls çoklu karşılaştırma testi ile tek yönlü ANOVA karşılaştırmaları için p<0,05 alınmıştır.

3.3. Mitokondriyal İşlev

Karaciğer mitokondriyal oksijen tüketimi, HFD-2 (MO)'da karma HFD-1'e göre daha yüksekti ve her iki grupta, Grafik 3.2'de gösterildiği gibi her iki mitokondriyal solunum durumunda 3 ve 4 HFD beslemesine cevap olarak azaldığı görülmüştür. Sunulan bu sonuçlar, ADP olmadan gözlenen herhangi bir fark olup olmadığını görmek için bir sübstrat olarak süksinat kullanılarak yapılmıştır. Daha sonra birleştirilmiş substratlar, 5 mM süksinat + 5 mM glutamat + 1 mM malat kullanılarak daha sonra ADP ilavesiyle araştırılmıştır. Karaciğer mitokondri tarafından Grafik 3.2'de gösterildiği gibi solunum HF-MO ile karşılaştırıldığında HF-karışımını azaltmıştır.

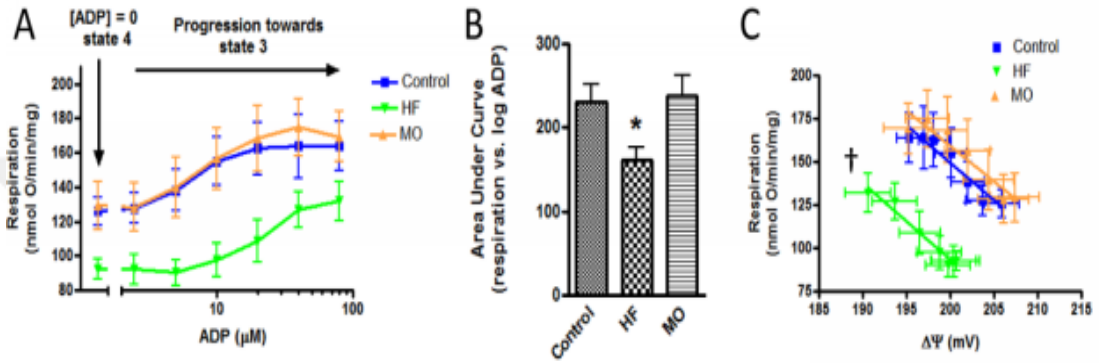


Grafik 3.2. Karaciğerde mitokondriyal oksijen tüketimi*

*O₂ tüketim hızları izole edilmiş mitokondri içinde sübstrat olarak süksinat kullanılarak ADP'nin yokluğunda (durum 4) ve varlığında (durum 3) ölçülmüştür.

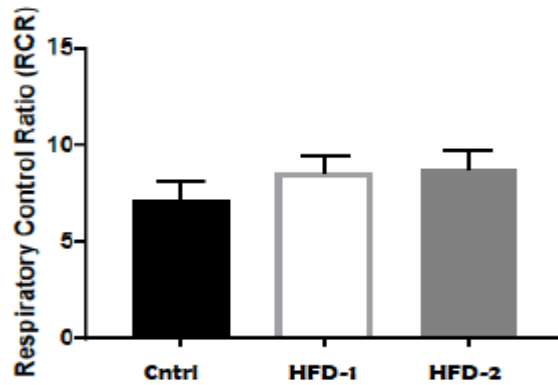
Solunum ayrıca, eklenen ADP'nin artan seviyelerinden kaynaklanan kelepçeli membran potansiyeline karşı ayarlanmıştır (Grafik 3.3). Bu, daha önce iskelet kası mitokondri (Glancy) için bildirilen kinetik gözlemlerle tutarlı lineer eğriler oluşturmuştur. Eğimlerin gruplar arasında benzer olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, HF ile beslenen fareler için regresyon çizgisi, kontrol ve MO ile beslenen farelere kıyasla sola çekilmiştir (verilen potansiyelde daha düşük solunum). Bu çekilme, değiştirilmiş mitokondriyal membran lipid bileşiminin bir sonucu olabilir, bu da daha sonra membran akışkanlığını değiştirir (Bedard ve Krause, 2007), bu nedenle

proton akımı ve ATP sentaz aktivitesini değiştiren mitokondri katlama modellerinde değişiklik oluşur (Chavez ve Summers, 2003; Kibbey vd., 2007). Bu ilişki, ayrıca solunum ADP seviyeleri tarafından oluşturulan solunum ve $\Delta\Psi$ arasında tanımlanmıştır (Grafik 3.3C), iskelet kası çalışmalarında daha önce tarif edilmiş olup, burada $\Delta\Psi$ kreatin fosfat ve kreatin kinaz (Hasselbaink vd., 2002) kullanılarak kenetlenmiştir. Bunlar, elektron taşınımının oksidatif fosforilasyon için ortaya çıkan itici güçle, yani membran potansiyeliyle orantılı olduğunu gösterdiler.



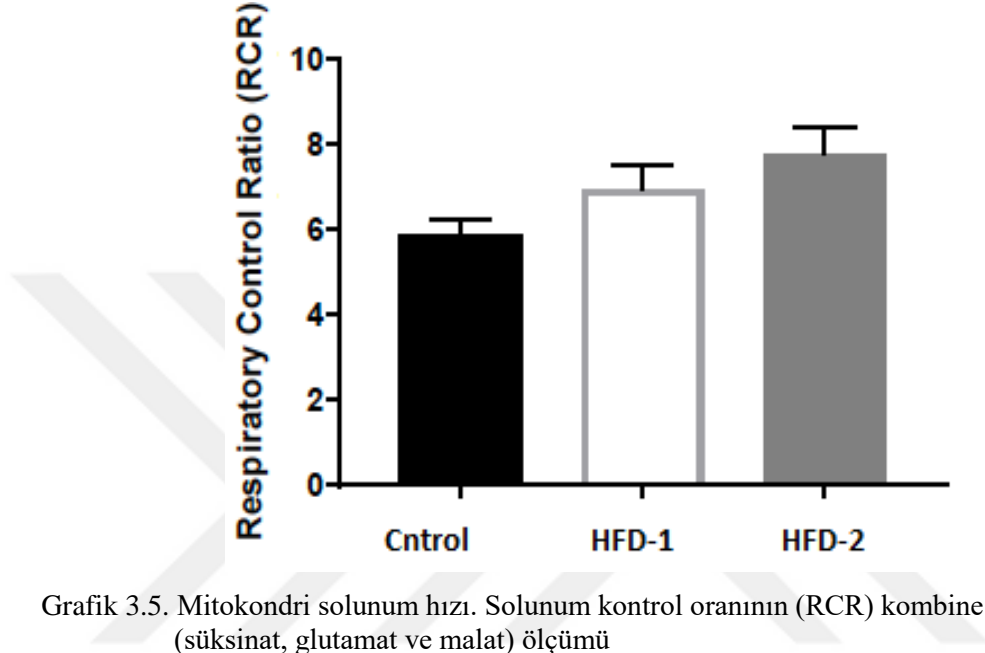
Grafik 3.3. Deneysel diyet farelerinin karaciğer mitokondrileri ile solunum durumlarını temsil eden ve keleççeli ADP'nin 4. durumdan 3. duruma değışken farklı seviyelerdeki solunumları*

*A) kontrol, yüksek yağ (HF) veya menhaden yağı (MO) ile tedavi edilmiş farelere ilave ADP'nin bir fonksiyonu olarak karaciğer mitokondri yoluyla solunum. B) A panelinin verileri, eğrilerin altındaki alanla karşılaştırıldı. C) Panelin artan ADP konsantrasyonlarından kaynaklanan kısmi iç zar potansiyelinin ($\Delta\Psi$) bir fonksiyonu olarak karaciğer mitokondri ile solunum.



Grafik 3.4. Mitokondri solunum hızı. Substrat olarak süksinat kullanılarak solunum kontrol oranının (RCR) ölçümü

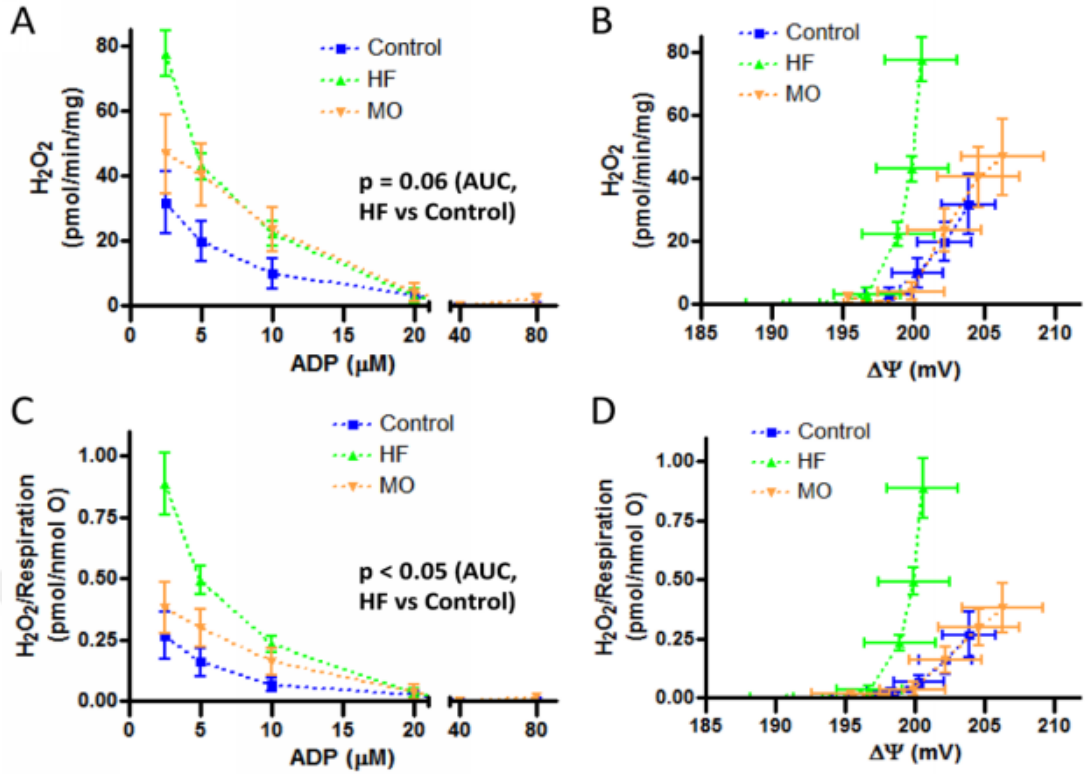
İzole edilmiş mitokondri için, kullanılan farklı substratlarda RCR değerlerinde anlamlı bir fark yoktu. Bununla birlikte, RCR değeri, karışık substratta, Grafik 3.5'te gösterildiği gibi artma eğiliminde oldu. Ancak, çalışma gruplarından alınan RCR, Grafik 3.4 ve Grafik 3.5'deki standart hata çubuklarında gösterildiği gibi kontrol grubundan önemli ölçüde farklıydı.



Grafik 3.5. Mitokondri solunum hızı. Solunum kontrol oranının (RCR) kombine substratların (süksinat, glutamat ve malat) ölçümü

3.4. Mitokondri Hidrojenperoksit Üretimi

H₂O₂ üretimi değerlendirildi ve beklendiği gibi karaciğer mitokondri tarafından ROS üretimi, artan ADP konsantrasyonları olan ve bütün solunum grupları ile solunumun durum 4'ten durum 3'e kadar değiştiği $\Delta\Psi$ 'deki ilişkili düşüş ile birlikte bütün diyet grupları için belirgin şekilde azaldı (Grafik 3.6A ve 3.6B). Karaciğer mitokondriler tarafından mutlak H₂O₂ üretimi (mg mitokondriyal protein başına üretilen H₂O₂) MO ve kontrol fareleri (Grafik 3.6A) ile karşılaştırıldığında HF açısından daha büyük olmuştur. Diyet rejimleri arasındaki fark, H₂O₂ üretimi, elde edilen kenetlenmiş $\Delta\Psi$ 'ye karşı şekillendirildiğinde (Grafik 3.6B) veya birim oksijen tüketimi başına H₂O₂ üretimi ifade edildiğinde daha belirgin hale geldi (Grafik 3.6C ve Grafik 3.6D). Oksijen tüketiminin elektron taşınmasıyla, yani ROS'un üretildiği süreçle orantılı olduğu unutulmamalıdır. HF ile beslenen fareler ayrıca, ATP başına daha fazla - biyolojik bir oksidatif fosforilasyonun "maliyeti" olan- H₂O₂ üretmiştir.



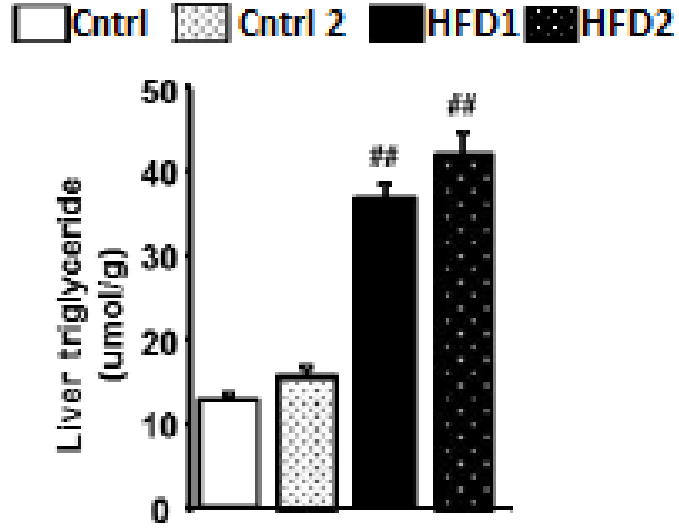
Grafik 3.6. Deneysel diyetlerle beslenen farelerin karaciğer mitokondriyle H₂O₂ üretimi*

*A ve B) Ortama eklenen (ADP) ve sonuçta elde edilen $\Delta\Psi$ (panel B) ADP'nin bir fonksiyonu olarak H₂O₂ üretimi için mutlak değerler. C ve D) Eklenen ADP (panel C) ve elde edilen kelepçeli $\Delta\Psi$ (panel D) bir fonksiyonu olarak birim solunum başına ifade edilen H₂O₂ üretimi.

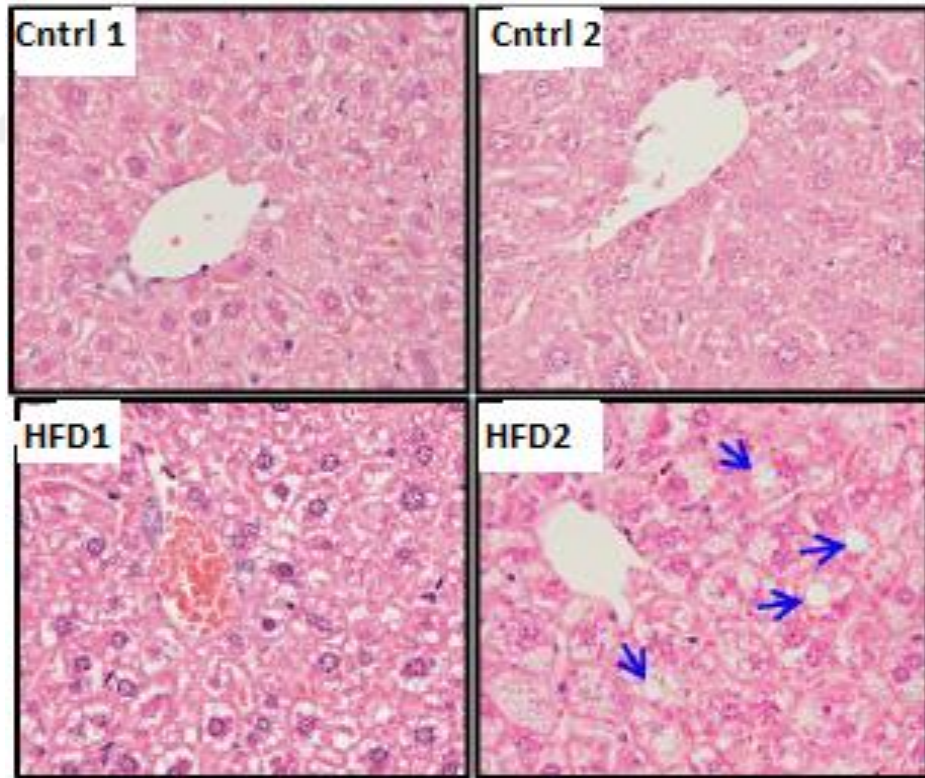
3.5. Diyetin Trigliserit Düzeyleri Üzerine Etkisi

Tek başına yüksek yağlı diyet karışımı karaciğer TG seviyelerini Protokol 1'den kontrol grubunun yaklaşık 3 katına çıkardı (Grafik 4.7). İki HFD arasında TG düzeylerinde anlamlı bir fark yoktu, ancak HFD MO diğerlerine göre daha fazla trigliserit seviyesine sahipti. TG'nin etkilerini belirlemek için, karaciğer kesitleri üzerinde HveE boyaması yaparak eşzamanlı histolojik değişiklikleri değerlendirdik (Grafik 4.8). Protokol 1 ve 2'den kontroller, benzer bir TG içeriği ve histolojik görünüm göstermiştir. HFD1 tek başına hepatositler içinde orta derecede mikroveziküler steatoz, HFD2 ise hem mikroveziküler hem de makroveziküler steatozu indüklemiştir. Oil Red O boyaması [171, 361, 362] ile yapılan doğrulamalara dayanarak, H&E içindeki boşluklar ($\geq 25 \mu\text{m}$, oklarla belirtilmiştir) lipit damlacıklarını

temsil edecek şekilde ölçülmüştür. HFD2 grubunda, genişletilmiş lipit damlacıklarının sayısı, HFD1 grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (Grafik 4.8).



Grafik 3.7. Diyetin karaciğer dokusunda trigliserit düzeylerine etkisi

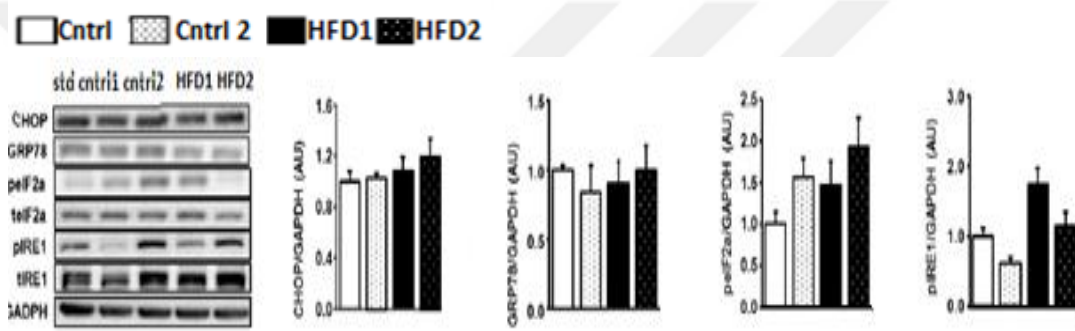


Fotoğraf 3.1. Karaciğerin histolojik kesiti (H&E x200)*

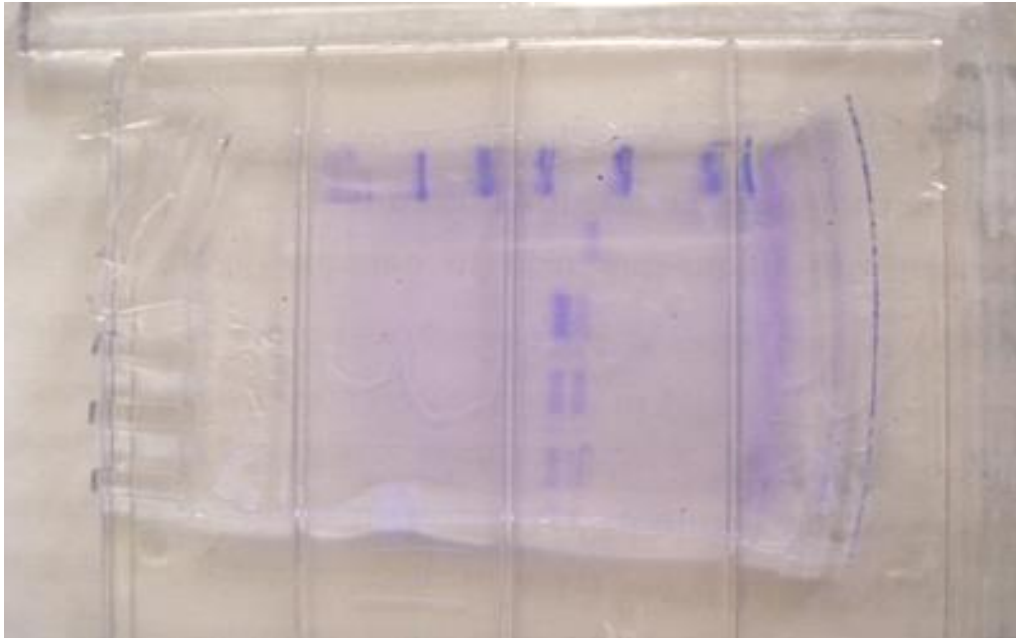
*Fare başına 6 rastgele alanda (200 x) büyük lipit damlacıklarının (çapı $\geq 25\mu\text{m}$) sayısı istatistiksel analiz için belirlenmiştir. Oklar, lipit damlacıklarının şeklini göstermektedir.

3.6. Karaciğerde Oksidatif Stresin Etkileri

Oksidatif stresin mitokondriyal fonksiyonun tanımlanmasında önemli bir rol oynamış oluğunu da öne sürdüğü için, bu çalışma daha sonra western blotlama yoluyla oksidatif stres ve anahtar protein seviyeleri için biyokimyasal belirteçleri ölçmüştür. Grafik 4.9, immünoblotlamadan önce SDS sayfasının bir jel resminin temsilidir. İmmünoblotların analizi, fosfor-eIF2 α CHOP ve GRP78'in protein seviyelerini içeren stres markörlerinin ekspresyonunda anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir (Grafik 4.10). Ancak, HFD2 grubundaki vahşi tip IRE1 fosforilasyonunun ifadesi diğerlerine kıyasla daha düşüktü.



Grafik 3.8. Diyetin karaciğerdeki oksidatif stres üzerine etkisi



Fotoğraf 3.2. İmmünoblotlama öncesi SDS sayfa jeli

Protein seviye belirteçleri western blot ile ölçülmüş ve GAPDH ile normalleştirilmiştir.

4. SONUÇ

Bu çalışmada, yağ asidi diyetinin karaciğerde mitokondri üzerine biyoenerjetik etkileri araştırılmıştır. Üç grup fareye üç farklı diyet uygulanmıştır (birisini normal diyet, diğer ikisi doymuş yağ (HF) ile beslenmiştir. HF'lerden biri yağın %50'sine ve n-3 bakımından zengin yağ asitlerine sahip menhaden yağı olarak verilmiştir).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre fareleri kontrollü bir diyetle tutmak, yağ dokusunun birikmesini etkilememektedir. Bununla birlikte, kontrol grubuyla yapılan yüksek yağlı diyetlerden alınan kilo artışı önemli ölçüde farklı bulunmuştur ($p < 0,05$). Dolayısıyla bu durum, yüksek bir yağ diyetinin farelerin vücut ağırlığını etkilediğini göstermiştir.

Karaciğer ağırlıkları ölçülmüş; ağırlıkta anlamlı bir fark olmamasına rağmen HFD-2 ile beslenenler için ortalama ağırlık, MO'nin yağ dokusu yağlarını azalttığını düşündüren daha düşük bir ağırlığa sahip olduğu görülmüştür.

HF ile beslenen farelerde, kontrollere kıyasla bütün vücut oksijen tüketimi azalmıştır. HF karışımı MO'lu HF'den daha düşük bir enerji harcamasına eğilimine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu, mitokondriyal biyoenerjetiği ve dolayısıyla düşük solunum potansiyelini engellediği gösterilen karışım ile doymuş yağ asitlerinin bir sonucu olabilir. Dolayısıyla bu, diğer araştırmacılar tarafından n-3 yağ asitlerinin, gelişmiş bir metabolik sistem sunduğu sebebiyle daha iyi bir yağ seçimi olduğu verilerini desteklemektedir.

Karaciğer mitokondri tarafından solunum HF-MO ile karşılaştırıldığında HF-karışımını azaltmıştır. Bununla birlikte, HF ile beslenen fareler için regresyon çizgisi, kontrol ve MO ile beslenen farelere kıyasla sola çekilmiştir. Bu çekilme, değiştirilmiş mitokondriyal membran lipid bileşiminin bir sonucu olabilir, bu da daha sonra membran akışkanlığını değiştirir, bu nedenle proton akımı ve ATP sentaz aktivitesini değiştiren mitokondri katlama modellerinde değişiklik oluşur.

Karaciğer mitokondri tarafından mutlak H_2O_2 üretimi (mg mitokondriyal protein başına üretilen H_2O_2) MO ve kontrol fareleri ile karşılaştırıldığında HF açısından daha

büyük olmuştur. Tek başına yüksek yağlı diyet karışımı karaciğer TG seviyelerini Protokol 1'den kontrol grubunun yaklaşık 3 katına çıkarmıştır. İki HFD arasında TG düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır, ancak HFD MO diğerlerine göre daha fazla trigliserit seviyesine sahip olduğu tespit edilmiştir.

İmmüno blotların analizi, fosfor-eIF2 α CHOP ve GRP78'in protein seviyelerini içeren stres markörlerinin ekspresyonunda anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Ancak, HFD2 grubundaki vahşi tip IRE1 fosforilasyonunun ifadesi diğerlerine kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür.

Bu nedenle, bu veriler HF'nin mitokondriyal biyoenerjettiği bozduğunu göstermenin yanısıra, menhaden yağında bulunan n-3 yağ asitleri doymuş yağ yerine kullanıldığında faydalar sunabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Alfenas, R. C. & Mattes, R. D. (2003). Effect of fat sources on satiety. *Obes Res*, 11(2), 183.
- Astrup, A. (2001). Healthy lifestyles in Europe: prevention of obesity and type II diabetes by diet and physical activity. *Public Health Nutr*, 4(2B), 499.
- Bedard, K. & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245,
- Bell, R. R., Spencer, M. J. & Sherriff, J. L. (1997). Voluntary exercise and monounsaturated canola oil reduce fat gain in mice fed diets high in fat. *J Nutr*, 127, 2006-2010.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. 5th edition. New York: W. H. Freeman.
- Boozer, C. N., Schoenbach, G. & Atkinson, R. L. (1995). Dietary fat and adiposity – a dose–response relationship in adult male rats fed isocalorically. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 268, 546-550.
- Boudina, S., Sena, S., Theobald, H., Sheng, X., Wright, J. J., Hu, X. X., Aziz, S., Johnson, J. I., Bugger, H., Zaha, V. G. & Abel, E. D. (2007). Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes*, 56, 2457-2466.
- Bourgeois, F., Alexiu, A. & Lemonnier, D. (1983). Dietary induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. *Br J Nutr*, 49, 17-26.
- Bray, G. A. & Popkin, B. M. (1998). Dietary fat intake does affect obesity. *Am J Clin Nutr*, 68, 1157-1173.
- Buettner, R., Parhofer, K.G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J. & Bollheimer, L. C. (2006). Defining high fat diet rat models: Metabolic effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*, 36, 485-501.
- Cappellini, M. D. & Fiorelli, G. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet*, 371(9606), 64-74.
- Cardoso A. R., Kakimoto P. A. & Kowaltowski, A. J. (2013). Diet-sensitive sources of re- active oxygen species in liver mitochondria: role of very long chain acyl-CoA dehydrogenases. *PLoS One*, 8, 77088.

- Carmiel-Haggai, M., Cederbaum, A. I. & Nieto, N. (2005). A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J*, 19(1), 136.
- Ceriello, A. (2003). New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*, 26(5), 1589.
- Chance, B. & Williams, G. R. (1955). A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*, 175, 1120-1121.
- Chavez, J. A. & Summers, S. A. (2003). Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys*, 419, 101-109.
- Cui, H., Kong, Y. & Zhang, H. (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct*, 2012, 646354.
- Degirolamo, C. & Rudel, L. L. (2010). Dietary monounsaturated fatty acids appear not to provide cardioprotection. *Curr Atheroscler Rep*, 12(6), 391-396.
- DeLany, J. P., Windhauser, M. M., Champagne, C. M. & Bray, G. A. (2000). Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*, 72, 905-911.
- Despres, J.P. & Lemieux, I., 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444, 881-887.
- Donnelly, J. E., Blair, S. N., Jakicic, J. M., Manore, M. M., Rankin, J. W. & Smith, B. K. (2009). American College of Sports Medicine Position Stand: Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc*, 41, 459-471.
- Drynan, L., Quant, P. A. & Zammit, V. A. (1996). Flux control exerted by mitochondrial outer membrane carnitine palmitoyltransferase over β -oxidation, ketogenesis and tricarboxylic acid cycle activity in hepatocytes isolated from rats in different metabolic states. *Biochem J*, 317, 791-795.
- Egnatchik, R. A., Leamy, A.K., Noguchi, Y. Shiota, M. & Young, J. D. (2014). Palmitate-induced activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative stress and apoptosis in H4IIEC3 rat hepatocytes. *Metabolism*, 63(2), 283.
- Ellis, J., Lake, A. & Hoover-Plow, J. (2002). Monounsaturated canola oil reduces fat deposition in growing female rats fed a high or low fat diet. *Nutr Res*, 22, 609-621.
- Fernie, A. R., Trethewey, R. N., Krotzky, A. J. & Willmitzer, L. (2004). Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 763-769

- Flachs, P., Horakova, O., Brauner, P., Rossmeisl, M., Pecina, P., Franssen-van Hal, N., Ruzickova, J., Sponarova, J., Drahota, Z., Vlcek, C., Keijer, J., Houstek, J. & Kopecky, J. (2005). Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia*, *48*, 2365-2375.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M. & Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, *114*(12), 1752.
- George, V., Tremblay, A., Despres, J. P., Leblanc, C. & Bouchard, C. (1990). Effect of dietary fat content on total and regional adiposity in men and women. *Int J Obes*, *14*, 1085-1094.
- Ghibaudi, L., Cook, J., Farley, C., van Heek, M. & Hwa, J. J. (2002). Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague–Dawley rats. *Obes Res*, *10*, 956-963.
- Grishko, V., Rachek, L., Musiyenko, S., Ledoux, S. P. & Wilson, G. L. (2005). Involvement of mtDNA damage in free fatty acid-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med*, *38*(6), 755.
- Hasselbaink, D. M., Roemen, T. H. & van der Vusse, G. J. (2002). Protein acylation in the cardiac muscle like cell line, H9c2. *Mol Cell Biochem*, *239*, 101-112.
- Hernandez, R., Martinez-Lara, E., Canuelo, A., del Moral, M. L., Blanco, S., Siles, E., Jiménez, A., Pedrosa, J. A. & Peinado, M. A. (2005). Steatosisrecovery after treatment with a balanced sunflower orolive oilbased diet: Involvement of perisinusoidal stellatecells. *World J Gastroenterol*, *11*, 7480-7485.
- Hill, J. O., Melanson, E. L. & Wyatt, H. T. (2000). Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J Nutr*, *130*, 284-288.
- Hoehn, K. L., Salmon, A. B., Hohnen-Behrens, C., Turner, N., Hoy, A. J., Maghzal, G. J., Stocker, R., Van Remmen, H., Kraegen, E. W., Cooney, G. J., Richardson, A. R. & James, D. E. (2009). Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, *106*(42), 17787.
- Hulbert, A. J., Turner, N., Storlien, L. H. & Else, P. L. (2005). Dietary fats and membrane function: Implications for metabolism and disease, *Biol Rev Camb Philos Soc*, *80*, 155-169.
- Hussein, O., Grosovski, M., Lasri, E., Svalb, S., Ravid, U. & Assy, N. (2007). Monounsaturated fat decreases hepatic lipid content innonalcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol*, *13*, 361-368.

- Kibbey, R. G., Pongratz, R. L., Romanelli, A. J., Wollheim, C. B., Cline, G. W. & Shulman, G. I. (2007). Mitochondrial GTP regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metab*, 5, 253-264.
- Kien, C. L., Bunn, J. Y. & Ugrasbul, F. (2005). Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *Am J Clin Nutr*, 82, 320-326.
- Koliaki, C., Szendroedi, J., Kaul, K., Jelenik, T., Nowotny, P., Jankowiak, F., Herder, C., Carstensen, M., Krausch, M., Knoefel, W. T., Schlensak, M. & Roden, M. (2015). Adaptation of hepatic mitochondrial function in humans with non-alcoholic fatty liver is lost in steatohepatitis. *Cell Metab*, 21(5), 739.
- Lawton, C. L., Burley, V. J., Wales, J. K. & Blundell, J. E. (1993). Dietary fat and appetite control in obese subjects: weak effects on satiation and satiety. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 17(7), 409.
- Lear, S. A., James, P. T., Ko, G. T. & Kumanyika, S. (2010). Appropriateness of waist circumference and waist-to-hip ratio cutoffs for different ethnic groups. *Eur J Clin Nutr*, 64(1), 42.
- Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T. Wang, H. & Yang, X. F. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol*, 6, 19.
- Lionetti, L., Mollica, M. P., Donizzetti, I., Gifuni, G., Sica, R., Pignatola, A., Cavaliere, G., Gaita, M., De Filippo, C., Zorzano, A. & Putti, R. (2014). High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria. *PLoS One*, 9(3), 92753.
- Maes, H. H., Neale, M. C. & Eaves, L. J. (1997). Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet*, 27(4), 325.
- Malaguarnera, L., Madeddu, R., Palio, E., Arena, N. & Malaguarnera, M. (2005). Heme oxygenase-1 levels and oxidative stress-related parameters in non-alcoholic fatty liver disease patients. *J Hepatol*, 42(4), 585.
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P. & Malik, A. B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*, 20(7), 1126.
- Nakamura, S., Takamura, T., Matsuzawa-Nagata, N., Takayama, H., Misu, H., Noda, H., Nabemoto, S., Kurita, S., Ota, T., Ando, H., Miyamoto, K. & Kaneko, S. (2009). Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem*, 284(22), 14809.

- O’Rahilly, S. & Farooqi, I. S. (2008). Human obesity: a heritable neurobehavioral disorder that is highly sensitive to environmental conditions. *Diabetes*, 57(11), 2905.
- Oono, Y., Chen, Q. G., Overvoorde, P. J., Kohler, C. & Theologis, A. (1998). Age mutants of arabidopsis exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell*, 10, 1649-1662.
- Opie, L. (2004). *Heart Physiology: From Cell to Circulation*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Paddon-Jones, D., Westman, E., Mattes, R. D., Wolfe, R. R., Astrup, A. & Westerterp-Plantenga, M. (2008). Protein, weight management, and satiety. *Am J Clin Nutr*, 87(5), 1558.
- Park, K., Gross, M., Lee, D. H., Holvoet, P., Himes, J. H., Shikany, J. M. & Jacobs, D. R. Jr. (2009). Oxidative stress and insulin resistance: the coronary artery risk development in young adults study. *Diabetes Care*, 32(7), 1302.
- Pepe, S., Tsuchiya, N., Lakatta, E. G. & Hansford, R. G. (1999). PUFA and aging modulate cardiac mitochondrial membrane lipid composition and Ca²⁺ activation of PDH. *Am J Physiol*, 276, 149-158.
- Piers, L. S., Walker, K. Z., Stoney, R. M., Soares, M. J. & O’Dea, K. (2003). Substitution of saturated with monounsaturated fat in a 4-week diet affects body weight and composition of overweight and obese men. *Br J Nutr*, 90, 717-727.
- Popkin, B. M., Keyou, G., Zhai, F., Guo, X., Ma, H. & Zohoori, N. (1993). The nutrition transition in China: a cross-sectional analysis. *Eur J Clin Nutr*, 47, 333-346.
- Prpic, V., Watson, P. M., Frampton, I. C., Sabol, M. A., Jezek, G. E. & Gettys, T. W. (2002). Adaptive changes in adipocyte gene expression differ in AKR/J and SWR/J mice during diet-induced obesity. *J Nutr*, 132, 3325-3332.
- Rector, R. S., Thyfault, J. P., Uptergrove, G. M., Morris, E. M., Naples, S. P., Borengasser, S. J., Mikus, C. R., Laye, M. J., Laughlin, M. H., Booth, F. W. & Ibdah, J. A. (2010). Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. *J Hepatol*, 52(5), 727.
- Roberts, C. K., Berger, J. J. & Barnard, R. J. (2002). Long-term effects of diet on leptin, energy intake, and activity in a model of diet-induced obesity. *J Appl Physiol*, 93, 887-893.
- Rohrbach, S. (2009). Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria. *Curr Pharm Des*, 15, 4103-4116.

- Samuel, V. T., Liu, Z. X., Qu, X., Elder, B. D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A. J. & Shulman, G. I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*, 279, 32345-32353.
- Scheffler, I. E. (2007). *Mitochondria*, Second Edition, Print ISBN:9780470040737 2008 John Wiley & Sons, Inc.
- Schrader, M. & Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*, 1763(12), 1755.
- Sekiya, M., Hiraishi, A., Touyama, M. & Sakamoto, K. (2008). Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 375(4), 602.
- Silva, A. P. S., Guimaraes, D. E. D., Mizurini, D. M., Maia, I. C., Ortiz-Costa, S., Sardinha, F. L. & do Carmo, M. G. (2006). Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. *Lipids*, 41, 535-541.
- Sreekumar, R., Unnikrishnan, J., Fu, A., Nygren, J., Short, K. R., Schimke, J., Barazzoni, R. & Nair, K. S. (2002). Impact of high-fat diet and antioxidant supplement on mitochondrial functions and gene transcripts in rat muscle, *Am. J Physiol: Endocrinol Metab*, 282, 1055-1061.
- Stumvoll, M., Goldstein, B. J. & van Haeften, T. W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*, 365(9467), 1333.
- Stunkard, A. J., Foch, T. T. & Hrubec, Z. (1986). A twin study of human obesity. *JAMA*, 256(1), 51.
- Stunkard, A. J., Harris, J. R., Pedersen, N. L. & McClearn, G. E. (1990). The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med*, 322(21), 1483.
- Sumida, Y., Niki, E., Naito, Y. & Yoshikawa, T. (2013). Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radic Res*, 47(11), 869.
- Szende, B., Timar, F. & Hargitai, B. (1994). Olive oil decreases liver damage in rats caused by carbon tetrachloride (CCl₄). *Exp Toxicol Pathol*, 46, 355-359.
- Takahashi, M., Ikemoto, S. & Ezaki, O. (1999). Effect of the fat/carbohydrate ratio in the diet on obesity and oral glucose tolerance in C57BL/6J mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 45, 583-593.
- Takeuchi, H., Matsuo, T., Tokuyama, K., Shimomura, Y. & Suzuki, M. (1995). Diet induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high-oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. *J Nutr*, 125, 920-925.
- Thuyle, T. T., Matsumoto, Y., Thuy, T. T., Hai, H., Suoh, M., Urahara, Y., Motoyama, H., Fujii, H., Tamori, A., Kubo, S., Takemura, S., Morita, T., Yoshizato, K. &

- Kawada, N. (2015). Cytochrome deficiency promotes liver cancer development from hepatosteatosis through activation of the oxidative stress pathway. *Am J Pathol*, 185(4), 1045.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilsa, R. D. & Huang, P. (2008). Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*, 10(8), 1343.
- Tucker, L. A. & Kano, M. J. (1992). Dietary fat and body fat: a multivariate study of 205 adult females. *Am J Clin Nutr*, 56, 616-622.
- Wang, H., Storlien, L. H. & Huang, X. F. (2002). Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and Arc leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282, 1352-1359.
- WHO, 2019. World Health Organization: Definition of Overweight and Obesity. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
- Williamson, J. R. & Cooper, R. H. (1980). Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett*, 117, 73-85.
- Yu, L., Fink, B. D., Herlein, J. A., Oltman, C. L., Lamping, K. G. & Sivitz, W. I. (2014). Dietary fat, fatty acid saturation and mitochondrial bioenergetics *J Bioenerg Biomembr*, 46(1), 33-44.
- Yuzefovych, L. V., Solodushko, V. A., Wilson, G. L. & Racheck, L. I. (2012). Protection from palmitate-induced mitochondrial DNA damage prevents from mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, and impaired insulin signaling in rat L6 skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 153(1), 92.
- Zock, P. L. (2006). Do favourable effects of increasing unsaturated fat intake on cardiovascular disease risk outweigh the potential adverse effect on body weight? *International Journal of Obesity*, 30, 10.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Ahmed Saleh Daw SMEA
Doğum Tarihi : 21.05.1989
Medeni Hali : Evli
Dil : Arapça, İngilizce, Türkçe
E-posta : ahmedalferjany.aa@gmail.com



Öğrenim Geçmişi

Lise : Life Sciences High School, Tarhounah-Libya
Lisans : Tripoli Üniversitesi, Tripoli-Libya

İş Deneyimi

Hospital of Tarhounah: Laboratuar Teknisyeni, Tahounah-Libya, 2012-2015