



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**7,8-DİHİDROKSİFLAVONUN KAFETERYA  
DİYETİ İLE UYARILMIŞ METABOLİK  
SENDROMDA PANKREAS VE KARACİĞER  
DOKULARINDAKİ ENDOPLAZMİK  
RETİKULUM STRESİNE ETKİSİNİN  
İNCELENMESİ**

Elif ŞAHİN

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ahmet ALVER

TRABZON-2023

## BEYAN

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

22/03/2023  
Elif ŞAHİN

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

#### İÇ KAPAK SAYFASI

#### ONAY

#### BEYAN

#### TEŞEKKÜR

#### İÇİNDEKİLER

vi

#### TABLolar DİZİNİ

ix

#### ŞEKİLLER DİZİNİ

x

#### RESİMLER DİZİNİ

xi

#### KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

xii

#### ÖZET

xv

#### ABSTRACT

xvi

#### 1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

#### 2. GENEL BİLGİLER

3

##### 2.1. Metabolik Sendrom

3

##### 2.1.1. Tanı Kriterleri

3

##### 2.1.2. Epidomiyolojisi

4

##### 2.1.3. Metabolik Sendrom için Önerilen Patofizyolojik Mekanizmalar

5

##### 2.1.3.1. İnsülin Direnci

5

##### 2.1.3.2. İnflamasyon ve Oksidatif Stres

6

##### 2.2. Metabolik Sendrom Geliştirmek İçin Kullanılan Hayvan Modelleri

7

##### 2.2.1. Kafeterya Diyeti

8

##### 2.3. Endoplazmik Retikulum

9

##### 2.3.1. Endoplazmik Retikulum Stresi

9

##### 2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Metabolik Sendrom

12

##### 2.4.1. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Diyabet

12

##### 2.4.2. Obezite ve Lipid Metabolizmasında Endoplazmik Retikulum Stresi

14

##### 2.4.3. Endoplazmik Retikulum Stresi ve İnflamasyon

15

##### 2.4.4. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Yağlı Karaciğer Hastalıkları

15

##### 2.5. Endoplazmik Retikulum Stresi ile Mücadelede Doğal Ürünler

16

|                                                                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5.1. 7,8-Dihidroksiflavon                                                                                                            | 17        |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                                                                              | <b>20</b> |
| 3.1. Gereç                                                                                                                             | 20        |
| 3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler                                                                                                  | 20        |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler                                                                                                    | 21        |
| 3.2. Kullanılan Deney Hayvanları ve Uygulanan Prosedür                                                                                 | 23        |
| 3.3. Serum Biyokimya Parametrelerinin Ölçümü                                                                                           | 25        |
| 3.4. Serum İnsülin Seviyesinin Ölçümü                                                                                                  | 25        |
| 3.5. Serum IL-1 $\beta$ Seviyesinin Ölçümü                                                                                             | 26        |
| 3.6. Oral Glukoz Tolerans Testi                                                                                                        | 27        |
| 3.7. Doku GRP78 ve CHOP Seviyelerinin Ölçümü                                                                                           | 27        |
| 3.7.1. Doku GRP78 Seviyesinin Ölçümü                                                                                                   | 27        |
| 3.7.2. Doku CHOP Seviyesinin Ölçümü                                                                                                    | 28        |
| 3.8. Karaciğer Trigliserid Seviyelerinin Ölçümü                                                                                        | 28        |
| 3.9. Protein Miktar Tayini                                                                                                             | 29        |
| 3.10. Gen Ekspresyonu Analizleri                                                                                                       | 30        |
| 3.10.1. Dietilpirokarbonatlı Suyun Hazırlanışı                                                                                         | 30        |
| 3.10.2. Karaciğer ve Pankreas Dokularından Total RNA İzolasyonu                                                                        | 30        |
| 3.10.3. Agaroz Jel Elektroforezi                                                                                                       | 31        |
| 3.10.4. Total RNA'dan Komplementer DNA Sentezi                                                                                         | 33        |
| 3.10.5. RT-PCR Analizleri                                                                                                              | 34        |
| 3.10.5.1. Gen Ekspresyonu Çalışmalarının Analizi                                                                                       | 39        |
| 3.11. Histopatolojik Analizler                                                                                                         | 39        |
| 3.11.1. Karaciğer, Pankreas ve Yağ Dokularının Histopatolojik Değerlendirilmesi                                                        | 39        |
| 3.11.2. İmmünohistokimyasal İşlemler                                                                                                   | 40        |
| 3.12. İstatistiksel Analizler                                                                                                          | 40        |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                                                                                     | <b>41</b> |
| 4.1.7,8-Dihidroksiflavonun Vücut Ağırlığı, Epididimal Yağ Dokusu ve %Adiposite İndeksi Üzerine Etkisi                                  | 41        |
| 4.2. 7,8-Dihidroksiflavonun Serum Biyokimya Parametreleri, İnsülin, İnterlökin-1 $\beta$ ve Doku Trigliserid Seviyeleri Üzerine Etkisi | 44        |
| 4.3. 7,8-Dihidroksiflavonun Oral Glukoz Toleransı Üzerine Etkisi                                                                       | 46        |

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4. 7,8-Dihidroksiflavonun Doku GRP78 ve CHOP Protein Seviyelerine Etkisi                                            | 48        |
| 4.5. 7,8-Dihidroksiflavonun GRP78 ve CHOP Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi                                          | 52        |
| 4.6. 7,8-Dihidroksiflavonun Histolojik Parametreler Üzerine Etkisi                                                    | 54        |
| 4.7. 7,8-Dihidroksiflavonun Apoptoz Üzerine Etkisi                                                                    | 57        |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>                                                                                           | <b>60</b> |
| <b>6. KAYNAKLAR</b>                                                                                                   | <b>68</b> |
| <b>EKLER</b>                                                                                                          | <b>86</b> |
| EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi                                                                                         | 87        |
| EK 2. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Programı Öğrencisinin Tezini Teslim Edebilme Koşulunu Sağladığına Dair Belge | 88        |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                                                       | <b>89</b> |

## TABLÖLAR DİZİNİ

| Tablo No                                                                                                        | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Tablo 1.</b> Kullanılan cihazlar ve malzemeleri                                                              | 20    |
| <b>Tablo 2.</b> Kullanılan ticari kitler, kimyasal maddeler ve üretici firmaları                                | 22    |
| <b>Tablo 3.</b> Kafeterya diyetini oluşturan ürünler ve enerji değerleri (100 g için)                           | 24    |
| <b>Tablo 4.</b> cDNA sentezinde bir örnek için gerekli reaktifler ve hacimleri                                  | 33    |
| <b>Tablo 5.</b> RT-PCR’da kullanılan primer dizileri                                                            | 34    |
| <b>Tablo 6.</b> Real Time PCR analizi için gerekli reaktifler ve hacimleri                                      | 35    |
| <b>Tablo 7.</b> RT-PCR protokolü                                                                                | 36    |
| <b>Tablo 8.</b> Grupların vücut ağırlıkları ile EYD ve %Adiposite İndeksi değerleri                             | 42    |
| <b>Tablo 9.</b> Serum biyokimya parametreleri ile insülin, HOMA-IR, IL-1 $\beta$ ve doku trigliserid seviyeleri | 45    |
| <b>Tablo 10.</b> Gruplara göre belirtilen dakikalardaki kan glukoz değerleri                                    | 48    |
| <b>Tablo 11.</b> Karaciğer ve pankreas dokularına ait GRP78 ve CHOP konsantrasyonları                           | 49    |
| <b>Tablo 12.</b> Karaciğer ve pankreas dokularına ait GRP78 ve CHOP ekspresyon sonuçları                        | 52    |
| <b>Tablo 13.</b> Karaciğer dokusuna ait morfolojik değişim skorları                                             | 55    |
| <b>Tablo 14.</b> Pankreas dokusuna ait morfolojik değişim skorları                                              | 57    |
| <b>Tablo 15.</b> Pankreas ve karaciğer dokusuna ait %AI değerleri                                               | 59    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil No                                                                                                  | Sayfa |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1. UPR sinyal yolları ve fonksiyonları                                                              | 10    |
| Şekil 2. İnsülin standart grafiği                                                                         | 26    |
| Şekil 3. IL-1 $\beta$ standart grafiği                                                                    | 26    |
| Şekil 4. GRP78 standart grafiği                                                                           | 27    |
| Şekil 5. CHOP standart grafiği                                                                            | 28    |
| Şekil 6. Protein standart grafiği                                                                         | 29    |
| Şekil 7. 16 haftalık diyet süresince gruplardaki ağırlık değişimi                                         | 41    |
| Şekil 8. Gruplara göre belirlenen dakikalarda kan glukozlarındaki değişim                                 | 46    |
| Şekil 9. Gruplara göre belirlenen dakikalarda kan glukozlarındaki değişim için eğrinin altında kalan alan | 47    |
| Şekil 10. Karaciğer (A) ve pankreas (B) dokularına ait GRP78 seviyeleri                                   | 50    |
| Şekil 11. Karaciğer (A) ve pankreas (B) dokularına ait CHOP seviyeleri                                    | 51    |
| Şekil 12. Karaciğer dokusunda GRP78 ve CHOP gen ekspresyonuna ait sonuçlar                                | 53    |
| Şekil 13. Pankreas dokusunda GRP78 ve CHOP gen ekspresyonuna ait sonuçlar                                 | 53    |

## RESİMLER DİZİNİ

| Resim No  |                                                                                         | Sayfa |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 1.  | Elde edilen RNA örneklerinin jeldeki görüntüsü                                          | 32    |
| Resim 2.  | <i>Actb</i> , <i>Hspa5</i> ve <i>Ddit3</i> genlerine ait amplifikasyon eğrisi           | 37    |
| Resim 3.  | <i>Actb</i> genine ait erime eğrisi                                                     | 37    |
| Resim 4.  | <i>Ddit3</i> genine ait erime eğrisi                                                    | 38    |
| Resim 5.  | <i>Hspa5</i> genine ait erime eğrisi                                                    | 38    |
| Resim 6.  | Besleme periyodu sonrasında kafeterya ve kemirgen diyetiyle beslenen farelerin EYD'leri | 43    |
| Resim 7.  | Yağ dokusuna ait fotomikrograf                                                          | 43    |
| Resim 8.  | Karaciğer dokusuna ait fotomikrograf                                                    | 54    |
| Resim 9.  | Pankreas dokusuna ait fotomikrograf                                                     | 56    |
| Resim 10. | Karaciğer dokusuna ait apoptoz görüntüleri                                              | 58    |
| Resim 11. | Pankreas dokusuna ait apoptoz görüntüleri                                               | 58    |



## KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

### Kısaltmalar

|                                |                                                             |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>%AI</b>                     | Yüzde apoptotik indeks                                      |
| <b>7,8-DHF</b>                 | 7,8-Dihidroksiflavon                                        |
| <b>AACE</b>                    | Amerikan Klinik Endokrinoloji Derneği                       |
| <b>AHA/NHLBI</b>               | Amerikan Kalp Derneği/Ulusal Kalp, Akciğer ve Kan Enstitüsü |
| <b>ALT</b>                     | Alanin aminotransferaz                                      |
| <b>AST</b>                     | Aspartat aminotransferaz                                    |
| <b>ATF4</b>                    | Aktive edici transkripsiyon faktörü 4                       |
| <b>ATF6</b>                    | Aktive edici transkripsiyon faktörü 6                       |
| <b>AYKH</b>                    | Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı                          |
| <b>BCA</b>                     | Bikinkoninik asit                                           |
| <b>BDNF</b>                    | Beyin kaynaklı nörotrofik faktör                            |
| <b>BİP</b>                     | İmmunoglobulin bağlayıcı protein                            |
| <b>cDNA</b>                    | Komplementer DNA                                            |
| <b>CHOP</b>                    | C/EBP homolog protein                                       |
| <b>DEPC</b>                    | Dietilpirokarbonat                                          |
| <b>DMSO</b>                    | Dimetil sülfoksit                                           |
| <b>EGIR</b>                    | İnsülin Direnci Çalışması için Avrupa Grubu                 |
| <b>eIF2<math>\alpha</math></b> | Ökaryotik başlatma faktörü 2 $\alpha$                       |
| <b>ER</b>                      | Endoplazmik retikulum                                       |
| <b>ERAD</b>                    | Endoplazmik retikulum ile ilişkili protein yıkımı           |
| <b>EYD</b>                     | Epididimal yağ dokusu                                       |
| <b>GRP78</b>                   | 78-kDa glukozla-düzenlenen protein                          |
| <b>H&amp;E</b>                 | Hematoksilen&Eozin                                          |
| <b>HOMA</b>                    | Homeostatik model değerlendirme                             |
| <b>IDF</b>                     | Uluslararası Diyabet Federasyonu                            |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | İnterlökin-1 $\beta$                                        |
| <b>IR</b>                      | İnsülin direnci                                             |
| <b>IRE1</b>                    | İnositol-gerektiren enzim 1                                 |
| <b>IRS</b>                     | İnsülin reseptör substratı                                  |

|                     |                                                                  |
|---------------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>IκB</b>          | İnhibitör kappa B                                                |
| <b>i.p.</b>         | İntraperitoneal                                                  |
| <b>JNK</b>          | c-Jun N-terminal kinaz                                           |
| <b>K</b>            | Kontrol                                                          |
| <b>KB</b>           | Kan basıncı                                                      |
| <b>KD</b>           | Kafeterya diyeti                                                 |
| <b>KTÜ</b>          | Karadeniz Teknik Üniversitesi                                    |
| <b>KVH</b>          | Kardiyovasküler hastalıklar                                      |
| <b>MetS</b>         | Metabolik sendrom                                                |
| <b>NCEP:ATP III</b> | Ulusal Kolesterol Eğitim Programı Yetişkin Tedavi Paneli III     |
| <b>NLRP3</b>        | NOD-, LRR- ve pirin domeini içeren protein 3                     |
| <b>OGTT</b>         | Oral glukoz tolerans testi                                       |
| <b>PCR</b>          | Polimer zincir reaksiyonu                                        |
| <b>PERK</b>         | Protein kinaz R-benzeri ER kinaz                                 |
| <b>RT-PCR</b>       | Real time-PCR                                                    |
| <b>T2D</b>          | Tip 2 diyabet                                                    |
| <b>TAE</b>          | Tris-Asetik Asit-EDTA                                            |
| <b>TrkB</b>         | Tropomiyozin ile ilişkili kinaz reseptörü B                      |
| <b>TUNEL</b>        | Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick uç<br>etiketleme |
| <b>UPR</b>          | Katlanmamış protein yanıtı                                       |
| <b>SREBP1-c</b>     | Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1-c                 |
| <b>VKİ</b>          | Vücut kitle indeksi                                              |
| <b>WHO</b>          | Dünya Sağlık Örgütü                                              |
| <b>XBP1</b>         | X-Kutusu bağlayıcı protein 1                                     |
| <b>VEGFR2</b>       | Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü 2                   |
| <b>Simgeler</b>     |                                                                  |
| <b>α</b>            | Alfa                                                             |
| <b>β</b>            | Beta                                                             |
| <b>Δ</b>            | Delta                                                            |
| <b>°C</b>           | Derece santigrat                                                 |
| <b>γ</b>            | Gama                                                             |
| <b>κ</b>            | Kappa                                                            |

|   |       |
|---|-------|
| L | Litre |
| μ | Mikro |
| U | Ünite |
| & | Ve    |



## ÖZET

### **7,8-Dihidroksiflavyonun Kafeterya Diyeti ile Uyarılmış Metabolik Sendromda Pankreas ve Karaciğer Dokularındaki Endoplazmik Retikulum Stresine Etkisinin İncelenmesi**

Metabolik sendromun patogeneğinde endoplazmik retikulum (ER) stresi önemli bir rol oynamaktadır. ER stresinin obeziteyi, insülin direncini, karaciğer yağlanması, dislipidemi ve diğer metabolik bozuklukları indüklediği bildirilmiştir. ER stresini baskılayacak veya ilişkili semptomları iyileştirecek molekülleri keşfetmeye yönelik önemli çabalar olmuştur. Bir bitki flavonoidi ve beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF) mimesi olan 7,8-dihidroksiflavyonun (7,8-DHF) vücut ağırlığını azaltması, sistemik enerji tüketimini artırması gibi faydalı etkileri ortaya konulmuştur. Bu çalışmada, 7,8-DHF'nin karaciğer ve pankreas dokularındaki ER stresi üzerine etkisinin kafeterya diyeti (KD) ile indüklü metabolik sendrom modelinde incelenmesi amaçlanmıştır. Her bir grupta 10 adet C57BL/6 ırkı erkek fare olacak şekilde dört grup oluşturuldu. 16 hafta boyunca KD ile beslenen farelere son dört hafta boyunca 7,8-DHF intraperitoneal olarak (5 mg/kg/gün) uygulandı. Gruplardaki her bir fareye oral glukoz tolerans testi (OGTT) yapıldı. Karaciğer ve pankreas dokularında 78-kDa glukozla-regüle protein (GRP78) ve C/EBP homolog protein (CHOP), serumda insülin ve interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ELISA yöntemi ile, serum biyokimya parametreleri otoanalizör ile analiz edildi. GRP78 ve CHOP gen ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile belirlendi. Ayrıca karaciğer ve pankreas dokularında histopatolojik analizler yapıldı. Bulgular, KD'nin serumda metabolik anormalliklere, insülin direncine ve inflamasyona neden olduğunu, pankreas ve karaciğer dokularında ER stresini tetiklediğini ortaya koymuştur. 7,8-DHF uygulamasının serum biyokimya parametrelerini, HOMA-IR ve IL-1 $\beta$  seviyelerini düşürerek metabolik anormallikleri önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. RT-PCR ve ELISA sonuçları, 7,8-DHF uygulamasının karaciğerde GRP78 ve CHOP ekspresyonunu ve protein seviyelerini, pankreasta GRP78 ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir. 7,8-DHF'nin bu dokulardaki etkinliği histopatolojik testlerle de gösterilmiştir. Sonuç olarak, KD ile indüklü metabolik sendrom modelinde 7,8-DHF hem karaciğer hem de pankreasta ER stresini ve ER stresinin neden olduğu metabolik bozuklukları baskılamıştır. Bu nedenle 7,8-DHF, ER stresini ve ilgili metabolik semptomları iyileştirmek için potansiyel olarak yeni bir terapötik bileşik olabilir.

**Anahtar Sözcükler:** ER stresi, Flavonoid, Metabolik Sendrom, Pankreas, RT-PCR

## ABSTRACT

### **Investigation of the Effect of 7,8-Dihydroxyflavone on Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic and Liver Tissues in Cafeteria Diet-Induced Metabolic Syndrome**

Endoplasmic reticulum (ER) stress plays a critical role in the pathogenesis of metabolic syndrome. ER stress has been documented to induce obesity, insulin resistance, fatty liver diseases, dyslipidemia and other metabolic disorders. There have been prominent works to detect molecules that would suppress ER stress or improve associated symptoms. The beneficial effects of 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF), a plant flavonoid and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mimetic have been shown such as reducing body weight and increasing systemic energy consumption. In this study, it was aimed to investigate the effects of 7,8-DHF on ER stress in liver and pancreatic tissues in a cafeteria diet (CAF) stimulated metabolic syndrome model. Four groups were formed each of which was composed of 10 C57BL/6 male mice. Mice fed with CAF for 16 weeks were administered 7,8-DHF intraperitoneally (5 mg/kg/day) for the last four weeks. An oral glucose tolerance test (OGTT) was conducted on each mouse in the groups. In liver and pancreas tissue, 78-kDa glucose regulated protein (GRP78) and C/EBP homologous protein (CHOP), serum insulin and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) with ELISA method, biochemical arguments were analyzed with autoanalyser. GRP78 and CHOP gene expression levels were done by RT-PCR. In addition, histopathological analyzes were accomplished on liver and pancreatic tissues. The findings revealed that CAF causes metabolic irregularities, insulin resistance and inflammation in serum, triggers ER stress in pancreatic and liver tissues. It has been indicated that the application of 7,8-DHF significantly reduces metabolic irregularities by diminishing serum biochemical parameters, HOMA-IR and IL-1 $\beta$  levels. RT-PCR and ELISA results show that 7,8-DHF administration suppresses GRP78 and CHOP expression and protein levels in the liver and GRP78 expression in the pancreas. The effectiveness of 7,8-DHF in these tissues has also been shown by histopathological tests. As a result, in the CAF triggered metabolic syndrome model, 7,8-DHF suppressed ER stress and metabolic disorders caused by ER stress in both the liver and pancreas. Therefore, 7,8-DHF could potentially be a new therapeutic compound to improve ER stress and related metabolic symptoms.

**Keywords:** ER stress, Flavonoid, Metabolic Syndrome, Pancreas, RT-PCR

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Metabolik sendrom (MetS), insülin direnci, aterojenik dislipidemi, merkezi obezite ve hipertansiyon gibi bir dizi metabolik bozukluktan oluşmaktadır. Devam eden süreçte MetS, diyabet ve kardiyovasküler hastalık (KVH) geliştirme riskini önemli ölçüde arttırmaktadır. KVH'lerin dünya çapında büyük oranda morbidite ve mortaliteye neden olduğu göz önüne alındığında, hastalığın sağlık sistemlerine ağır yükünü azaltmak için bu hastalıklara MetS'inin katkısının araştırılması zorunlu hale gelmiştir. Bu nedenle hastalığın araştırılması için yapılan klinik çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır (1). MetS patofizyolojisi genel olarak insülin direnci (IR) ve kronik düşük dereceli inflamasyonla ilişkilidir. Bunun yanı sıra KVH, tip 2 diyabet (T2D), alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (AYKH) gibi pek çok metabolik hastalıkta yaygın olarak bulunan, yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin durumunu ifade eden ER stresi MetS gelişiminde önemli bir mekanizma olarak ortaya çıkmıştır (2).

Bazı hayvanlarda genetik ve spontan mutasyonlar nedeniyle diğerlerinde ise yüksek yağ ve/veya yüksek karbohidratlı diyetler gibi enerjice yoğun diyetlere maruz bırakılmasıyla MetS tetiklenmektedir (3). KD, kemirgenlerin hiperfajiyi ve hızlı kilo alımını teşvik eden yüksek enerjili, oldukça lezzetli insan gıdalarına maruz bırakılmasından oluşan, diyet indüklü obezitenin (DIO) sağlam bir modelidir (4, 5).

ER stresini engellemek suretiyle MetS semptomlarını hafifletmeye yönelik çalışmalarda doğal ürünler sıklıkla kullanılmaktadır (6). 7,8-DHF, *Godmania aesculifolia*, *Tridax procumbens* ve çuha çiçeği yapraklarında bulunan doğal olarak oluşan bir flavondur. BDNF ana sinyal reseptörü olan tropomiyozin reseptör kinaz B'nin (TrkB) ( $K_d \approx 320$  nM) güçlü ve seçici, küçük moleküllü agonisti olarak hareket ettiği bulunmuştur (7). BDNF yiyecek ve enerji metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Ancak düşük yarılanma ömrü ve kan beyin bariyerini geçememesi nedeniyle kronik bir hastalık olan MetS'deki etkinliğini araştırmak oldukça zordur (8-10). 7,8-DHF, bu bağlamda güçlü bir alternatiftir. Yüksek yağlı diyetle beslenen dişi farelerde enerji tüketimini ve insülin duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir (11). Başka bir çalışmada da yine yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde kilo kaybına neden olduğu, hiperlipidemi ve hiperinsülinemiyi azalttığı gösterilmiştir (12). Tüm bunlar göz önüne alındığında, bu tez çalışmasında kafeterya diyetiyle uyarılmış fare metabolik sendrom modelinde, enerji metabolizması için iki önemli organ olan karaciğer ve pankreas dokularında meydana gelen ER stresine karşı 7,8-DHF'nin

etkili bir bileşik olup olmayacağının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla 16 hafta boyunca KD uygulanan C57BL/6 ırkı farelere diyetlerin son dört haftası süresince, 5 mg/kg/gün olacak şekilde 7,8-DHF uygulaması yapıldı. Bu kapsamda 7,8-DHF'nin insülin direncine, genel metabolik durum üzerine, ER stresi parametreleri üzerine etkisi biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler seviyede araştırıldı. Bulgular, 7,8-DHF'nin karaciğer ve pankreas dokularında ER stresini azalttığını, glukoz intoleransını ve insülin direncini baskıladığını göstermiştir.



## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Metabolik Sendrom**

Metabolik sendrom, dünya genelinde bir salgın olarak kabul edilen ve sosyoekonomik maliyeti yüksek kompleks bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. MetS, KVVH ve T2D riskini doğrudan artıran, birbirine bağlı faktörler kümesi olarak tanımlanır. Her ne kadar MetS'in başlıca bileşenleri dislipidemi, arteriyel kan basıncının (KB) yükselmesi ve düzensiz glukoz homeostazı olsa da, abdominal obezite ve/veya IR sendromun temel göstergeleridir. Son zamanlarda, kronik proinflatuar ve protrombotik durumlar, AYKH ve uyku apnesi gibi anormallikler sendromun varlığına eklenmiş ve sendromun tanımı oldukça karmaşık hale gelmiştir. MetS'in birçok bileşeninin ve klinik etkilerinin olmasına rağmen, genel kabul görmüş bir patojenik mekanizması yoktur. MetS'in gelişen temel bir yönü, hem çocuklarda hem de genç erişkinlerde artan yaygınlığı ve bunun sağlık sistemlerine gelecekteki etkileridir (13). Bu nedenle MetS'i önleyebilecek yeni terapötik etkenlerin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

#### **2.1.1. Tanı Kriterleri**

Tarihsel olarak Reaven, 'Sendrom X' kavramını (daha sonra MetS olarak yeniden adlandırdı) öne süren ilk kişidir ve IR gelişiminin, KVVH ve T2D gelişiminde merkezi bir özellik olduğunu varsaymıştır (14). O tarihten beri, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), İnsülin Direnci Çalışması için Avrupa Grubu (EGIR), Ulusal Kolesterol Eğitim Programı Yetişkin Tedavi Paneli III (NCEP:ATP III), Amerikan Klinik Endokrinoloji Derneği (AACE), Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) ve Amerikan Kalp Derneği/Ulusal Kalp, Akciğer ve Kan Enstitüsü (AHA/NHLBI) gibi birçok uluslararası kuruluş ve uzman grubu MetS'i tanımlamada kullanılan tüm farklı bileşenleri birleştirmek için çalışmışlardır. İlk adım 1998'de WHO öncülüğünde gerçekleştirilmiştir. MetS'i IR veya glukoz toleransının bozulması veya T2D'nin yanında aşağıda belirtilen parametrelerden en az ikisinin mevcudiyeti ile birlikte tanımlanabileceğini belirtmiştir:Yüksek KB, hipertrigliseridemi ve/veya düşük HDL-kolesterol, obezite (bel/kalça oranı veya vücut kitle indeksi (VKİ) ile ölçüldüğü gibi) ve mikroalbuminüri (15). Daha sonra EGIR, hiperinsülineminin mevcut olmasını gerektiğini ortaya koyarak mikroalbuminürinin sendromun bütünleyici bir bileşeni olmadığını ortaya koymuştur (16). Ek olarak, sendromun diğer bileşenleri için bir önceki parametrelerde daha farklı sınırlar çizilirken, obeziteyi ifade etmek VKİ yerine bel çevresi temel parametre olarak gösterilmiştir. 2001 yılında NCEP: ATPIII, bel çevresi, kan lipidleri,



KB ve açlık glukozu gibi parametreleri içeren yeni bir dizi kriter yayınlamıştır (17) ve bu kriterler 2004 yılında güncellenmiştir (18). NCEP:ATPIII tanımı, hem WHO hem de EGIR tanımlarından, IR'nin gerekli bir belirteç olarak kabul edilmemesi yönüyle farklılık göstermektedir. 2005 yılında IDF, farklı araştırma grupları tarafından sendromu daha kesin olarak tanımlayabilmek için kullanılabilen yeni kriterler yayınlamıştır. Bu yeni tanımın amacı, özellikle KVK, inme ve T2D gibi metabolik hastalıkları tedavi etmede daha iyi sonuçlar elde edebilmek için çalışma sonuçları arasında karşılaştırmalara olanak sağlamaktır (19). IDF, basit bir tarama aracı olarak bel ölçümüne özellikle vurgu yaparak, abdominal obeziteyi MetS tanısının kaçınılmaz bir parametresi olarak ileri sürmüştür (18). Abdominal obezite farklı şekilde tanımlanmış olmasına rağmen MetS'in geri kalan dört bileşeni, AHA/NHLBI tanımında IDF'ninkilerle aynıdır. Şu anda, en yaygın kullanılan iki tanım olan NCEP:ATP III ve IDF kriterleri, özellikle merkezi obezitenin bir ölçüsü olan bel çevresine yoğunlaşmıştır. AACE, WHO ve EGIR tanımlarının ise genel olarak IR'ye odaklanmış durumdadır. Tüm bunlara rağmen, WHO ve NCEP: ATPIII tanımlarında özellikle obeziteyi tanımlarken farklı etnik gruplar arasında kriterlerin uygulanması hususunda zorluklar yaşanmıştır. Örneğin, Avrupalılara kıyasla Asyalılarda daha az obez birey olmasına rağmen T2D riski olan bireyler daha fazladır. IDF, tüm etnik kökenler arasında geçerli olan MetS tanı kriterleri belirlemenin zorluklarını kabul ederek, etnik/ırksal özel kesimlere göre yeni tanı kriterleri ileri sürmüştür (20). Bu zorluklar göz önüne alındığında, MetS'in nedenini açıklayabilecek daha fazla çalışma yapıncaya kadar MetS için zorunlu bir tanı kriteri olmaması gerektiği, aksine tüm bileşenlerin risk tahmininde önemli bir yere sahip olduğunu vurgulayan Ortak Ara Bildirim genel olarak kabul edilmektedir (13). Bu tanı kriterleri insanlardaki MetS'i tanımlamak için kullanılsa da, hayvanlardaki MetS'i tanımlamak için kesin tanı kriterleri bulunmamaktadır. Hayvanlarda MetS gelişip gelişmediği obezite, hiperglisemi ve dislipidemi gibi metabolik bozuklukların varlığı ile değerlendirilmektedir (21).

### **2.1.2. Epidemiyolojisi**

Metabolik sendromun küresel prevalansı coğrafi bölgelere ve sosyodemografik faktörlerin yanı sıra kullanılan tanı kriterlerine göre farklılık göstermektedir. Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Anketi verileri, NCEP:ATPIII kriterlerine göre, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki yetişkinlerin %35'inin (erkeklerde %30.3 ve kadınlarda %35.6) ve 60 yaş üstü nüfusun %50'sinin MetS tanısı aldığını tahmin etmektedir (22). IDF tanı kriterleri

kullanılarak, Avrupa MetS prevalansı erkeklerde %41 ve kadınlarda %38 olarak tahmin edilmiştir (23). NCEP:ATPIII kriterlerine göre, Orta Doğu'dan elde edilen epidemiyolojik verilerin sistematik bir incelemesi, erkeklerde MetS prevalansının %20.7-37.2 ve kadınlarda %32.1-42.7 olduğunu bildirmektedir (24). Çin'den gelen veriler ise, 60 yaş ve üzerindeki popülasyonda %58.1 prevalans olduğunu göstermektedir (25). Onat ve ark. (26) tarafından gerçekleştirilen Türkiye'deki MetS oranlarını belirlemek için yapılan NCEP:ATPIII kriterlerine dayalı Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri çalışmasında, 2010 yılında 40 yaş ve üzerindeki popülasyonda genel MetS prevalansının %53, cinsiyete göre ise erkeklerde %49.6, kadınlarda ise %54.5 olduğu bildirilmiştir. MetS prevalansı coğrafi bölgelere göre karşılaştırıldığında ise genel dağılım Ege bölgesinde en düşük bulunurken, bu değerler Karadeniz ve güney bölgelerimizde daha yüksek bulunmuştur.

### **2.1.3. Metabolik Sendrom için Önerilen Patofizyolojik Mekanizmalar**

Metabolik sendrom patofizyolojisi altında yatan birkaç varsayımsal mekanizma vardır ve bunlardan en yaygın olarak kabul edileni insülin direncidir. Diğer potansiyel mekanizmalar, düşük dereceli kronik inflamasyon, oksidatif stres ve ER stresidir.

#### **2.1.3.1. İnsülin Direnci**

Pankreatik  $\beta$  (beta) hücreleri tarafından yüksek kan glukozuna yanıt olarak salgılanan bir peptid hormonu olan insülin anabolik etkilerini karaciğer, kas ve yağ dokularında glukoz alımını arttırarak, lipolizi ve hepatik glukoneogenezi inhibe ederek göstermektedir. Yağ dokusunda insülin direnci geliştiğinde, bu dokuda insülin aracılı lipoliz inhibisyonunda bir bozulma meydana gelmektedir. Dolaşımdaki serbest yağ asitlerinde ortaya çıkan artış, farklı organlarda insülin sinyal kaskadında değişikliklere neden olarak insülin direncini arttırmakta ve böylece bir kısır döngü yaratmaktadır. Kaslarda, serbest yağ asitleri insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) ile ilişkili fosfotidil 3 kinaz (PI3K) aktivitesini etkileyerek, GLUT-4'ün membrana translokasyonunda bir azalmaya ve dolayısıyla glukoz alımının azalmasına yol açmaktadır. Serbest yağ asitleri karaciğerde glukoneogenezi ve lipogenezi teşvik eder. Tüm bunların sonunda oluşan durum normal glukoz seviyesini korumak için hiperinsülineminin meydana gelmesidir. Bununla birlikte, bu telafi edici mekanizma en nihayetinde başarısız olmakta ve insülin seviyelerinde bir azalmaya yol açmaktadır. Bu durum serbest yağ asitlerinin pankreas beta hücreleri üzerindeki lipotoksik etkisi ile daha da artmaktadır. Visseral lipolizin splanknik dolaşım yoluyla serbest yağ asitlerinin doğrudan karaciğere girişini arttırdığını ve böylece visseral yağ oluşumunun insülin direncine subkutan yağdan

daha önemli katkılar yaptığını vurgulamak gerekmektedir (1). İnsülin direncinin MetS'e bir diğer katkısı, serbest yağ asitleri yüzünden kısmen insülinin vazodilatör etkisinin kaybından, reaktif oksijen türleri üretimi ve ardından nitrik oksidin ortamdan uzaklaştırılması nedeniyle vazokonstriksiyondan kaynaklanan hipertansiyon gelişimidir (27). Diğer mekanizmalar, artmış sempatik stimülasyonu ve böbreklerde renin kaynaklı sodyum geri emilimini içermektedir. Ayrıca, insülin direnci daha yüksek serum viskozitesine yol açmakta, protrombotik bir durum yaratmakta ve adipoz dokudan proinflamatuvar sitokin salınımını arttırmaktadır. Bunların tümü KVH ve T2D risklerinin artmasında önemli rol oynamaktadır (1).

#### **2.1.3.2. İnflamasyon ve Oksidatif Stres**

MetS'in gelişimi tam olarak anlaşılamamasına rağmen, merkezi etiolojisinde obezite ve insülin direnci bulunmaktadır. Bu durum, T2D ve KVH için önemli bir risktir. Obezitede olduğu gibi MetS'de de düşük seviyeli kronik inflamasyondan söz edilir. Bu inflamatuvar sürecin gelişmesinde yağ dokusu oldukça önemlidir. MetS, proinflamatuvar ve protrombotik bir durum olarak tanınır ve patofizyolojisinde yağ dokusunun merkezi bir rolü vardır. Adipoz doku, biyolojik olarak aktif parakrin ve endokrin bir organ olarak kabul edilmektedir. Aşırı beslenmeye yanıt olarak adiposit hücreleri hipertrofiye ve hiperplaziye uğrar ve bu durum hipoksik bir ortam oluşmasını tetikler. Hipoksi, makrofaj infiltrasyonu ile hücre nekrozuna ve proinflamatuvar medyatörler interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü alfa'nın (TNF $\alpha$ ) yanı sıra protrombotik medyatör plazminojen aktivatör inhibitörü-1 içeren adipositokinlerin üretimine yol açarak inflamasyonu uyarmaktadır (28, 29).

Yapılan insan ve hayvan çalışmalarında, yağ birikimi ve oksidatif stres arasında reaktif oksijen türlerinin üretimi ve artan NADPH oksidaz ekspresyonu ile birlikte antioksidan enzimlerin ekspresyonunun azalması arasında pozitif bir korelasyon olduğu bulunmuştur. *İn vitro* çalışmalarda, artan seviyelerde yağ asidi ile muamele edilen adiposit hücrelerinde NADPH oksidaz yolağı üzerinden oksidatif stresin arttığı ve bu durumun adipositokinlerin üretiminde disregülasyona neden olduğu gözlenmiştir (30). Ek olarak, NADPH oksidaz inhibitörü ile muamele edilen obez farelerde, diyabet fenotipinde iyileşme ve reaktif oksijen türlerinin üretiminde azalma bulunmuştur (31). Okside LDL ve ürik asit gibi prooksidan durum göstergeleri de MetS'de artmıştır (32).

## 2.2. Metabolik Sendrom Geliştirmek İçin Kullanılan Hayvan Modelleri

Metabolik sendrom, çeşitli patolojik durumların bir toplamıdır ve tek bir nedeni yoktur. MetS gelişimine katkıda bulunan bileşenler kalıtım veya çevre faktörlü olabilir. Ailede T2D öyküsü, yüksek tansiyon, etnik köken ve IR gibi birçok bileşen MetS'a yakalanma olasılığını önemli ölçüde artıran genetik faktörlerdir. Ayrıca yaşlanma MetS için değiştirilemez diğer bir önemli risk faktörüdür. Öte yandan, MetS için çevresel risk faktörleri kontrol edilebilmektedir. Bunlar hareketsiz yaşam tarzı, fiziksel hareketsizlik ve yeme alışkanlıklarını içermektedir. MetS sonuç olarak bir kişiyi birçok tıbbi komplikasyona daha yatkın hale getirmektedir. Örneğin MetS, KVK, T2D, AYKH, kanser (karaciğer, pankreas, meme ve mesane), böbrek ve pankreas disfonksiyonu riskinde artışa neden olmaktadır (21).

Obezite ve MetS dünya çapındaki ölümlerin ana nedenleri arasındadır ve patojenik mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle MetS'in sağlık sistemleri üzerine binen yükünü azaltmak için yeni tedavi şekilleri geliştirmeye yönelik yapılan araştırma çabaları büyük önem arz etmektedir. Çok faktörlü doğası nedeniyle, insanlardaki MetS patofizyolojisini anlamak için yeterli bir deneysel model geliştirmek oldukça zordur. Sıçanlar ve fareler MetS patafizyolojisini incelemek için kullanılan en yaygın kemirgen modelleridir. Kemirgenlerde MetS'i indüklemek için diyet manipülasyonu, genetik modifikasyon ve ilaç uygulamaları gibi çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Panchal ve Brown (33) tarafından yapılan bir çalışmada insanlardaki MetS'e en yakın kriterleri gösteren sıçan modelinin yüksek karbohidratlı ve yüksek yağlı diyetle uyarılan model olduğu gösterilmiştir. Hayvanlarda MetS'i indükleyebilen çok sayıda ve çeşitte diyet yaklaşımı vardır. Bu diyet yaklaşımları tek bir diyet türünden veya yüksek fruktoz, yüksek sukroz, yüksek yağ, yüksek fruktoz/yüksek yağlı veya yüksek sukroz/yüksek yağlı diyet gibi diyetlerin bir kombinasyonundan da oluşabilir. Ancak bu modellerden hiç birisi insanlardaki MetS'i tam olarak karşılamamaktadır. Buna rağmen diyet çalışmaları, diyetlerin hormon, glukoz ve lipid metabolizması yollarını etkilemek yoluyla tüm vücut metabolizmasını ve regülasyonunu etkilemesinden dolayı MetS'in araştırılmasında önemli bir yere sahiptir (21). MetS'i uyarmak için en yaygın kullanılan kemirgen türleri ise Sprague-Dawley sıçanları, Wistar sıçanları, C57BL/6J fareleri ve Altın Suriye hamsteridir (34-37). MetS'i incelemek için en iyi diyet modellerden biri ise, insan metabolik sendromundaki mevcut olan hemen hemen tüm komplikasyonları geliştirdiğinden dolayı kafeterya diyeti ile beslenen kemirgen modelleridir (5).

### 2.2.1. Kafeterya Diyeti

Ticari kemirgen yemini desteklemek için insan diyetinden son derece lezzetli öğelerin kemirgen diyetine eklenmesi fikri Sclafani ve Springer (4) tarafından öne sürülmüştür ve bu diyet daha sonra KD olarak adlandırılmıştır. Bu modelde, laboratuvar kemirgenleri insanların tükettiği, süpermarketlerden ve fast food restoranlarından kolayca elde edilebilen işlenmiş, sağlıksız ama lezzetli ürünleri (örneğin sosis, kekler ve kurabiyeler) tüketmektedir. Bu nedenle "Abur Cubur Diyeti (Junk Food Diet)", "Süpermarket Diyeti" veya "Western Diyeti" olarak da adlandırılmaktadır. KD modeli insanlarda sağlıksız bir diyet modelini taklit etmektedir. Önemli olan, aşırı tüketimi teşvik eden gıda maddelerinin duyuşal özelliklerini (koku ve doku gibi) ve lezzetini tekrarlamaktır. KD kullanıldığında abur cubur yemenin metabolik ve davranışsal nedenleri, her ikisi de aynı etiyolojiyi paylaştığı için kemirgenlerde ve insanlarda aynıdır (38). Gıda tercihi ve aşırı yeme, gıdanın besin bileşiminden daha fazlası tarafından etkilenmektedir. Obezojenik (obeziteyi indükleyen) modeller değerlendirilirken gıda türlerinin hedonik (haz verici, zevk verici) özellikleri dikkate alınmalıdır. KD modeli, yüksek yağ/ yüksek sukrozdan farklı olarak, birincil ve ikincil tat kortekslerini aktive etmekte ve ayrıca ödül sistemini de uyarmaktadır (39).

Kafeterya diyeti modeli obezojenik model olarak önemli bir yere sahiptir. Sadece vücut ağırlığını arttırdığı ve obeziteye neden olmadığı, aynı zamanda MetS, şiddetli diyabetik semptomlar, karaciğer inflamasyonu ve diğer metabolik düzensizliklere neden olduğu da kanıtlanmıştır (40-44). Aslında KD, obeziteyi ve komorbid metabolik düzensizlikleri ve patolojilerini yüksek fruktoz/yüksek sukroz diyetlerine göre daha verimli bir şekilde indüklemektedir (5, 45, 46). KD, sürekli hiperfaji ve artan enerji alımını indüklerken belirli bir tür yağın çok yüksek alımını engellediği için, obeziteyi indükleyen saflaştırılmış yüksek yağlı diyetlere nispeten daha güçlü bir alternatif haline gelmiştir (40, 41). Bu diyetler ayrıca iştahı artıran önemli miktarda şeker ve tuz içermektedir (47). Kullanışlı özelliklerine rağmen, kafeterya diyetinin, farklı yiyecek seçimine bağlı olarak aynı gruptaki hayvanlar arasında tüketilen besinlerde bir miktar değişiklik oluşturabileceği bildirilmiştir (48). Ayrıca araştırmacılar KD oluştururken kendi ülkelerine has farklı "abur cubur" yiyecekler kullandıkları için KD standartlaştırılmamış uygulamalara da sahiptir (49). Öte yandan, yüksek yağlı diyetlere nazaran KD neticesinde elde edilen sonuçların (tek bir yağ çeşidi kullanılmadığı için) insanlarda gözlemlenen diyet düzenlerini daha iyi yansıttığı

ifade edilmiştir (50). Diyet ve MetS arasındaki ilişkinin insan çalışmalarındaki etkisini belirlemek için “Western tipi” diyet kalıplarının kullanılmasının diğer diyet modellerine göre daha güçlü bir çalışma temeli sağladığı da gösterilmiştir (46).

### **2.3. Endoplazmik Retikulum**

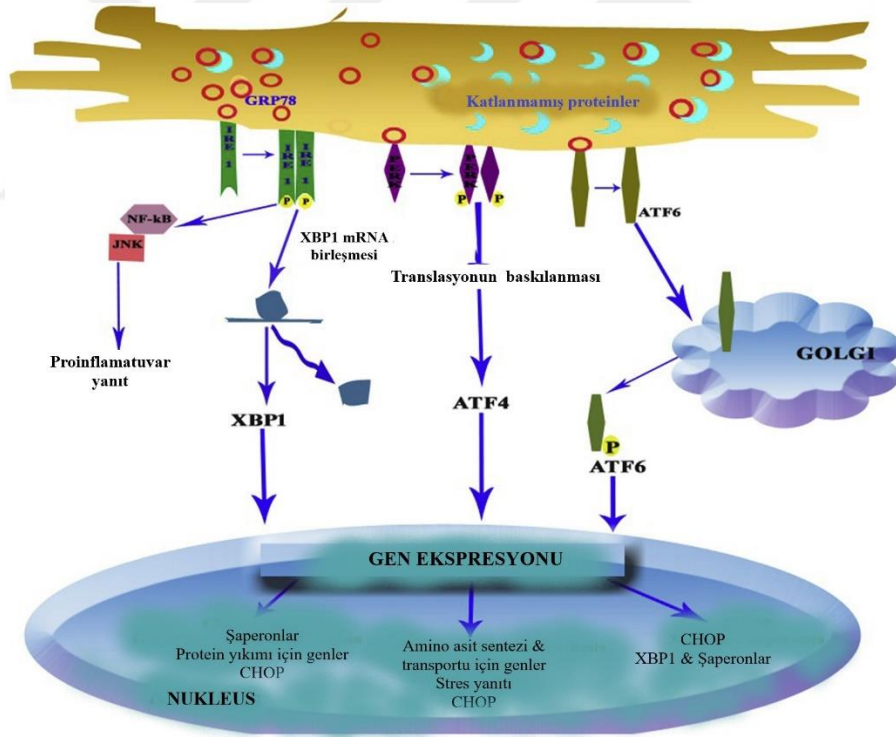
Endoplazmik retikulum, pürüzsüz ve pürüzlü ER gibi farklı yapı elemanlarından oluşan, hücre içindeki en büyük ve birçok fonksiyona sahip organeldir. ER'nin iyi bilinen görevlerinden bazıları kolesterol, gliserofosfolipid ve seramid gibi lipidlerin üretimi, protein sentezi, kalsiyumun depolanması ve dinamiklerinin düzenlenmesidir (51). ER, ökaryotik hücrelerdeki proteinlerin en az üçte birinin sentezini, katlanmasını ve transportunu yöneten özelleşmiş bir organeldir. Organellere ve hücre dışı boşluğa giden tüm proteinlerin biyogenezini, katlanmasını, birleştirilmesini, transportunu ve yıkımını izleyen bir süreç olan proteostaz olarak adlandırılan protein homeostazını düzenlemektedir. Bu proteinler, ER'de, golgi cisimciğinde, lizozomlarda ve plazma zarında bulunan, önemli hücresel süreçleri düzenleyen ve ayrıca hücreler arası iletişime aracılık etmek için hücrelerden salgılanan proteinlerden oluşmaktadır. Yüksek kalitede protein katlanması hücrenin hayatta kalması, işlevi ve normal organizma fizyolojisi için gereklidir. ER'de doğru şekilde katlanmış, modifiye olmuş ve birleştirilmiş proteinlerin anterograd taşınmasını sağlamak için çeşitli kontrol mekanizmaları mevcuttur (52, 53). Katlanmamış protein yanıtı (UPR), ER ile ilişkili bozunma (ERAD) ve otofaji gibi çeşitli kalite kontrol yollarının varlığı ER homeostazını sürdürmek için gereklidir (54).

#### **2.3.1. Endoplazmik Retikulum Stresi**

Endoplazmik retikulum stresi, yıkım sistemlerinin uygun bir şekilde çalışmaması nedeniyle ER lümeninde yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesi olarak tanımlanır ve membranöz ağ içinde meydana gelir. Bu durum sırasında, ER homeostazı bozulur ve UPR başlatılır. UPR, yeni sentezlenen proteinler ile ER'nin bunları doğru katlama kapasitesi arasında bir denge sağlamak için homeostatik bir mekanizmadır. ER şaperonlarının azlığı, aşırı protein sentezi,  $Ca^{2+}$  konsantrasyonundaki dengesizlik ve kolesterol birikimi gibi kronik durumlar ER stresinin gelişmesindeki ana faktörlerdir (55). Yağ dokusunda ER stresi, yağ dokusu metabolizması için çok önemli olan protein translayonunun fazla olduğu aşırı besin alındığı dönemlerde tetiklenmektedir. İnsülin direncine bağlı azalan vaskülarizasyon ve lokal glukoz eksikliği de diğer faktörlerdir. Ayrıca yüksek yağlı diyet ER stresini indüklemeye önemli bir rol oynamaktadır (56). Diyabetes

mellitus, obezite, yağlı karaciğer hastalıkları, KVH'ler, nöronal hastalıklar ve bazı kanser türleri gibi metabolik sendrom bileşenlerinde ER stresinin rolü olduğu ortaya konmuştur (57).

ER membranının dış yüzünde bulunan üç protein (Şekil 1) ER stresini düzenler: İnositol-gerektiren enzim 1 (IRE1), protein kinaz R-benzeri ER kinaz (PERK) ve aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6). Genellikle, bu proteinler ER membranı üzerinde bulunan GRP78'e (ayrıca immunoglobulin bağlayıcı protein (BİP) veya ısı şoku 70 kDa proteini 5 (Hspa5) olarak da bilinir) bağlanırlar. GRP78, protein katlanmasını teşvik etmek ve protein birikmesini önlemek için enerji kaynağı olarak ATP kullanır. ER'de yerleşik şaperonlar arasında GRP78, UPR sinyalinin başlaması için temel algılayıcıdır. ER stresinde, GRP78 lümendeki katlanmamış proteinlere bağlanıp UPR'nin aktivasyonunu tetiklemektedir (53).



Şekil 1. UPR sinyal yolları ve fonksiyonları (Mohan'dan, 58)

Bu yollar arasında IRE1 sinyal yolu canlılar arasında en fazla korunan yoldur. Bu transmembran proteini ER membranı üzerinde eksprese edilir ve iki fonksiyonlu bir enzim görevi görür. ER stresi sırasında aktive edilen IRE1, X-kutusu bağlayıcı protein 1 (XBP1) mRNA'sının birleştirilmesini ve ekspresyonunu artırır. Bunun sonucunda ERAD bileşenlerinin seviyeleri, ER ısı şok proteinleri ve fosfolipid sentezi artar. Bu bileşikler UPR'nin yapısal bir belirteci olan ER membran genişlemesine yol açmaktadır. Bu arada IRE1'in RNaz aktivitesi nedeniyle, ER lümenine protein girişi azalır. Karaciğerde, hem XBP1 hem de IRE1, trigliserid sentezi ve lipid metabolizmasında da rol oynamaktadır (59).

PERK, her yerde bulunan tip I ER transmembran protein kinazdır, yapısal olarak IRE1'e benzer ve salgı hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir (60). UPR aktivasyonu sırasında PERK, serin rezidüsü üzerinden ökaryotik başlatma faktörü 2 alfa'yı (eIF2 $\alpha$ ) fosforilleyerek etkisiz hale getirir. eIF2 $\alpha$ , ökaryotlarda protein sentezi için kritik bir faktördür. Başlatıcı tRNA'nın ribozomlara girişini kolaylaştırır ve peptid sentezini başlatır. Ancak eIF2 $\alpha$  etkisiz hale geldiğinde, protein sentezi baskılanır. ER stresi sırasında PERK yanıtı sadece şaperon seviyesindeki değişikliklere, daha spesifik olarak GRP78 seviyesine bağlıdır. PERK sıklıkla monomerik formda GRP78 ile ilişkilidir. GRP78 yanlış katlanmış proteinlere karşı yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu ilgi stres durumunda GRP78'in, PERK-GRP78 kompleksinden ayrılmasına ve yanlış katlanmış proteinlere bağlanmasına sebep olur. Bu PERK otofosforilasyonuna ve PERK'in eIF2 $\alpha$ 'ya olan afinitesinin yükselmesine yol açar (61). ER stresinde proteinlerin translasyonel regülasyonu çok önemlidir. Stres koşullarında PERK ve eIF2 $\alpha$  alt üniteleri tek bir serin rezidüsünden fosforile edilir. Bununla birlikte, substratta serinin alanine dönüştüğü bir mutasyon meydana geldiğinde, bu proteinlerin fosforilasyonu engellenir. Bu, farelerde pankreas beta hücrelerinin tahrip olmasına ve ayrıca hiperleptinemi, hiperinsülinemi ve yüksek kan şekeri seviyeleri gibi MetS semptomlarına neden olmaktadır (62). Bu arada, aktive edici transkripsiyon faktörü 4'ün (ATF4) mRNA ekspresyonu aktive edilir. Aktive edilen ATF4 daha sonra amino asitlerin hücreye alınmasında ve glutatyon biyosentezinde yer alan genleri uyarmaktadır. Bu yolla biriken yanlış katlanmış proteinler azaltılır. ATF4 tarafından düzenlenen öncelikli genlerden biri, apoptotik bir programın transkripsiyonel aktivatörü olan CHOP'tur (63).



IRE1 ve PERK ile karşılaştırıldığında, ATF6 bir tip II transmembran proteindir. ATF6 $\alpha$  ve ATF6 $\beta$  olmak üzere iki çeşidi vardır. ER stresi başlatıldığında, ATF6'nın golgiye lokalizasyon sinyali açığa çıkar ve ATF6 proteaza maruz kalacağı golgiye taşınır. ATF6'nın kesilen kısımları, lipid sentezi ve ERAD sisteminde yer alan birkaç genin aktivatörü olarak işlev görür. Buna ek olarak bu kesilen kısımlar, GRP78, GRP94, protein disülfür izomeraz, XBP1 ve CHOP eksprese etmek için ilgili genleri de aktive eder (64). ATF6 dolaylı olarak otofajiyi ve apoptozu uyarır. Wolfram sendrom 1 proteini ATF6'nın aktivitesini kontrol eder. Bu proteinin işlevi ATF6'yı ubiquitinasyona ve ardından proteazomal yıkıma yönlendirmektir (65).

## **2.4. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Metabolik Sendrom**

Klinik öncesi ve klinik çalışmalarda, ER stresinin obezite, ateroskleroz, diyabet, miyokardiyal disfonksiyon ve AYKH gibi metabolik sendrom bileşenleri üzerinde büyük etkisinin olduğu gösterilmiştir (66).

### **2.4.1. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Diyabet**

Pankreas beta hücresi ana insülin kaynağıdır ve insülin başlangıçta tek bir proinsülin molekülü olarak sentezlenen anabolik bir hormondur. İnsülin daha sonra ER içinde, üç molekül içi disülfid bağı oluşturmak yoluyla olgunlaşma işlemine tabi tutulur (67). Diyabet yetersiz insülin sekresyonu, periferik insülin direnci ve düzensiz hepatik glukoz üretimi gibi karmaşık fizyolojik değişikliklerle karakterize metabolik bir hastalıktır. *In vitro*, *in vivo* ve insan çalışmalarından elde edilen sonuçlar neticesinde, ER stresine indüklenen pankreatik beta hücre yıkımının hem tip 1 hem de tip 2 diyabet için ana neden olduğu doğrulanmıştır (68). Pankreas beta hücrelerindeki ER stresini başlatan patolojik, çevresel ve genetik faktörler arasında glukolipotoksisite, inflamatuvar yanıtlar, amiloid birikimi ve mutant proinsülinin ekspresyonu bulunmaktadır. Konjenital diyabet, insülin geninin iki alelinden birindeki değişiklikler ile karakterize edilen bir tür yenidoğan diyabetidir. Bu durumda, proinsülinin katlanması tamamen gerçekleşmez ve bu da uzun süreli ER stresi ve beta hücre fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. Bu mutasyon, beta hücre harabiyeti ve diyabet de gösteren Akita diyabetik farelerinde indüklenmektedir (69).

Tip 2 diyabet gelişimi, öglisemiye sağlamak için pankreatik beta hücrelerinden insülin üretimini artırır ve aşırı insülin üretimi ER stresine yol açmaktadır. İnsülin direnci, T2D ve obezitenin en önemli sonuçlarından biridir. Son çalışmalar ER stresinin IR'ye

önemli bir katkıda bulunabileceğini göstermektedir (68). Karaciğerde IR, hiperglisemi ile ilişkili hiperlipidemiye neden olacak şekilde artmış hepatik glukoneogenez ve lipogeneze yol açmaktadır. T2D'de, insülin direnci başlangıçta hiperglisemiye neden olmakta, ancak daha sonra beta hücrelerindeki harabiyet sonucu meydana gelen insülin eksikliği hastalığının gelişimine katkıda bulunmaktadır. Karaciğerde ER stresi, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve inhibitör kappa B'nin (I $\kappa$ B) IRE1 aracılı aktivasyonu ile başlatılmaktadır. Aktive edilmiş JNK, IRS 1 ve 2'nin serin rezidülerini fosforilleyerek insülinin fonksiyon göstermesini engellemektedir (70).

ER stresi sırasında IRE1 proteininin aktivasyonu, yeni oluşan insülinin sentezi ve olgunlaşması için gereklidir. IRE1, insülin mRNA'sının ekspresyonunu doğrudan aktive etmekte ve optimal beta hücre fonksiyonu için gereklidir. Ancak aşırı aktive IRE1, JNK ve kaspazların başlatılması yoluyla beta hücre kaybına da neden olabilmektedir. PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP yolağı, beta hücresinin normal işleyişi ve hayatta kalma yeteneği arasında bir geçiş görevi görmektedir. Wolcott Rallison sendromu, kemik, karaciğer, böbrek ve nöronları etkileyen nadir bir otozomal çocukluk çağı diyabet şeklidir. PERK geninin her iki alelinin inaktivasyonu ile karakterize edilir ve insülin salgılayan beta hücrelerinin kaybını takiben  $\alpha$  hücrelerinin imha edilmesi de gelir. Bu etkilerin her ikisi de pankreasın fonksiyonunu yerine getirememesine neden olmaktadır (69). Bu bulgular PERK'in pankreastaki glukoz metabolizmasının sürdürülmesindeki önemini göstermektedir. Palmitat gibi serbest yağ asitleri UPR'nin üç proteinini de aktive etmekte, bu durum beta hücrelerinin apoptozu ile sonuçlanmaktadır. Hem *in vitro* hem de hayvan çalışmaları, artmış kan glukoz ve doymuş serbest yağ asidi seviyelerinin proapoptotik UPR'yi tetikleyen başlıca faktörler olduğunu göstermektedir. CHOP proapoptotik etkisini ancak ER stresi ile istenmeyen ve/veya yanlış katlanmış proteinlerin miktarları arasında bir dengesizlik olduğunda gösterir. Aynı zamanda CHOP, apoptotik Bcl-2 benzeri protein 11'in ekspresyonunu arttırırken, antiapoptotik B hücreleri lenfoma 2'nin ekspresyonunu azaltmaktadır (71). Bunun aksine, CHOP geninin silinmesiyle, farelerde genetik ve diyetle indüklenen diyabet modellerinde beta hücrelerinin korunacağı (72) ve böylece pankreastaki ER stresini baskılamak yoluyla da hepatik yağlanmanın azaltılacağı gösterilmiştir (73).

#### 2.4.2. Obezite ve Lipid Metabolizmasında Endoplazmik Retikulum Stresi

Hücre içinde ER, fosfolipidlerin ve sterollerin sentezlendiği bir mutfak gibidir. Tüm hücrel membranların lipid bileşenleri burada oluşmaktadır. Obezitede alınan aşırı enerji adiposit, karaciğer, pankreas, kalp ve kas gibi dokularda lipid damlacıklarının içinde trigliserid olarak depolanmaktadır. Adipositler enerji depolamak için kullanılan ana hücreler olmanın yanı sıra, endokrin bir organ olarak da fonksiyon göstermektedirler. Metabolik sendromun iki kritik faktörü olan inflamasyon ve enerji metabolizmasında adipositler rol oynamaktadır. Lipotoksisite, patofizyolojik koşullarda hücrel hasarın önde gelen nedenlerinden biridir. Lipotoksistide, hücreler lipid damlacık üretimi için daha fazla proteini birleştirmek, metabolizma için gerekli enerjiyi karşılamak ve glukoz eksikliğini idame ettirmek için ciddi strese maruz kalmaktadır. Bu fazla enerjinin kullanımı ve depolanması için insülin, visfatin, leptin ve omentin gibi birçok hormon ve adipokin birlikte çalışmaktadır. Bu durum lipid damlacık oluşumunda ve böylece lipid metabolizmasını sürdürmede ER'nin rolünü ortaya koymaktadır (74).

Aşırı protein oluşumu ve bunların ER içine taşınması, düşük dereceli inflamasyon ile UPR sinyalini ve IR'yi başlatmaktadır. Çok sayıda çalışma UPR'nin metabolizma ve lipid homeostazisinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (6, 75). ER biyogenezi ve genişlemesinde önemli bir protein olan XBP1'in aşırı ekspresyonu pre-adipositlerde ER'de bulunan ana membran lipidi olan fosfatidilkolinin oluşumuna katılan enzim kolin fosfat sitidiltransferazı aktive etmektedir. Fosfat sitidiltransferaz eksikliğinin lipid damlacıklarının füzyonunu etkilediği belirtilmiştir. Bu nedenle XBP1, lipid metabolizmasında yer alan ana proteindir (76). Karaciğerdeki GRP78'in aşırı ekspresyonu, glukoz homeostazını düzenlemekte ve karaciğer lipid metabolizmasında ER'nin önemini kanıtlayan sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1c (SREBP-1c) aktivitesini azaltarak hepatik yağlanmayı azaltmaktadır (77). IRE1, PERK ve ATF6 ER stresine duyarlı proteinlerdir ve lipid metabolizmasında bağımsız rollere de sahiptirler. Karaciğer lipid metabolizmasının ana düzenleyicisi IRE1-XBP1 yoludur. Karaciğer hücrelerinde spesifik IRE1 delesyonu, CHOP gibi genlerin ve trigliserid sentezinden sorumlu genlerin ekspresyonunu arttırarak hepatik lipid seviyelerinin artmasına neden olmaktadır (78).

### 2.4.3. Endoplazmik Retikulum Stresi ve İnflamasyon

Obezite ile ilişkili insülin direnci ve diyabetin altında yatan mekanizma kronik düşük dereceli inflamasyon gelişimidir. ER stresi sırasında, IRE1-XBP yolu, TNF $\alpha$  ekspresyonunu aktive etmektedir. Aynı zamanda, ER stresinin PERK kolu, JNK yolunun aktivasyonu ile hücrel inflamatuvar kaskatını başlatmaktadır. Aktif ATF6, IL6 ve TNF $\alpha$  ekspresyonunu ve ayrıca aktive edilmiş B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir güçlendirici (NF- $\kappa$ B) sinyalizasyonunu arttırmaktadır. Bunun sonunda anti-inflamatuvar protein kinaz B (PKB) yolu inhibe edilmektedir (79). Aynı zamanda artan JNK pro-inflamatuvar sitokinleri (IL-6 gibi) ve birçok kemokini aktive etmektedir. Bu yol inflamasyonu bölgesinin etrafındaki ve dolaşımdaki makrofajların da ana aktivatörüdür. Daha sonra yağ dokusunda makrofajlar adipositleri içine almakta ve obezitenin ayırt edici özelliği olan taç benzeri yapılar oluşmaktadır. Bu arada, bu yapılar adipositlerde lipolizi aktive etmektedir. Sonuç olarak, serbest yağ asidi seviyeleri artmakta, karaciğerde ve kaslarda biriken serbest yağ asitleri hücrel disfonksiyona neden olmaktadır (80). Bu durum, yağlı karaciğer ve kardiyovasküler hastalıkların ana nedenlerinden biridir. Diyabette yüksek diasilgliseroller, serin/treonin kinazlar yoluyla insülin sinyalini inhibe eden ve nihayetinde insülin direncine yol açan protein kinaz C'yi aktive eder. ER stresi sırasında PERK, I $\kappa$ B kinaz beta aktivasyonunu indükleyip ve daha sonra adiponektin üretimini azaltmaktadır. Adiponektin, adipositler tarafından üretilen, KVH ve yağlı karaciğer hastalığını baskılayan başlıca anti-inflamatuvar sitokinlerden biridir (81). ER stresinin NOD-, LRR- ve pirin domeini içeren protein 3 (NLRP3) inflamazom kompleksini uyarak kaspaz-1'leri aktive ettiği ve bunun neticesinde IL-1 $\beta$  ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını da arttırdığı ortaya konmuştur (82).

### 2.4.4. Endoplazmik Retikulum Stresi ve Yağlı Karaciğer Hastalıkları

ER stresi yağlı karaciğer hastalıklarının patogeneğinde önemli bir role sahiptir. UPR yolu, hepatosit ölümünün başlatılması için kritik bir faktör ve potansiyel bir inflamasyon promotörüdür. Hepatositler, ksenobiyotiklerin metabolizması, plazma proteinleri, lipoproteinler ve kolesterol sentezi gibi birçok metabolik işlevi yerine getirmektedir (83). Bunlar ER'nin ana fonksiyonları olduğu için, hepatositler hem kaba hem de pürüzsüz ER yönünden zengindir. Pürüzsüz ER, ribozomlardan yoksundur ve lipid sentezi için ana bölgedir. Pürüzsüz ER'nin hücre iskeleti ile bir bağlantısı vardır. Bu yolla ER, lipidleri ve Ca<sup>2+</sup>u bitişik zarlara ve organellere taşımaktadır (84).

Adından da anlaşılacağı gibi karaciğer yağlanması, karaciğerin yağlarla özellikle de trigliseridlerle yüklendiği durumdur ve AYKH olarak tanımlanır. Bu biriken lipidlerin karaciğere öncelikli girişi diyetten, *de novo* lipogenezden ya da yağ dokusundan salınma yoluyla gerçekleşmektedir. Doymamış yağ asitleri ile karşılaştırıldığında, doymuş yağ asitleri ciddi ER stresine neden olmakta ve bu da karaciğer hasarıyla sonuçlanmaktadır (85). Üç UPR yolağı, ER stresinde farklı şekilde fonksiyon gösterir. Hem IRE1 hem de PERK, otofosforilasyonla aktive olurken, ATF6'nin aktivasyonu bu molekülün golgiye lokalizasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Aktive IRE1 çekirdekteki şaperonların, büyüme durdurması ve DNA hasarı (GADD) ve ERAD genlerinin seviyelerini XBP1 mRNA'sının aktivasyonu ile arttırmaktadır. Aktive edilmiş GADD daha sonra karaciğer hücrelerini apoptoza duyarlı hale getirmektedir. Stres altındaki hücrelerde IRE1, JNK'nin aktivasyonu yoluyla inflamasyonu ve IR'yi başlatmaktadır. Aktive JNK, IRS1'i serin rezidüsünden fosforilleyerek insülin reseptör yolağını inhibe etmekte ve bu durum hiperinsülinemi ve artan lipogenez ile sonuçlanmaktadır (86). Aynı zamanda hepatositlerde NLRP3 inflamazom kompleksi de aktive olmaktadır. NLRP3 karaciğer hücrelerinde IR'yi başlatır ve inflamasyonu teşvik etmektedir (87). UPR tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerinden hücreyi korumak için p-PERK, redoks durumunu koruyan nükleer eritroidle ilgili faktör 2'nin (Nrf2) transkripsiyonunu başlatmaktadır. PERK yolu ayrıca Nrf2'nin aktivasyonu yoluyla reaktif oksijen türlerini de azaltmaktadır (88).

## **2.5. Endoplazmik Retikulum Stresi ile Mücadelede Doğal Ürünler**

Endoplazmik retikulum stresıyla ilişkili komplikasyonların, doğal ürünler tarafından azaltılmasının hedeflenmesi, metabolik sendromun birçok belirtisini hafifletmek için heyecan verici bir terapötik pencere açmıştır. Birçok fitokimyasal, ER stresini antioksidan özellikleriyle azaltma ve/veya normalleştirme potansiyeli göstermiştir (6). MetS gelişimi için iki ana hücrel sebep: Reaktif oksijen türleri tarafından üretilen ve ER ile ilişkili strestir. Bu sebeple, bu tür streslerin azaltılmasında antioksidan bileşiklerin önemli rolleri olabileceği ifade edilmiştir. Bunlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir. Butillenmiş hidroksilanizol (BHA), UPR stresini ve membran proteinlerinde reaktif oksijen türlerinin aracılık ettiği hasarı ve programlanmış hücre ölümünü azaltan yaygın olarak kullanılan bir antioksidan ve gıda katkı maddesidir (89). Kuersetin iyi bilinen bir antioksidandır ve doğal bileşiklerde bol miktarda bulunur. Antioksidan enzimlerin aktivasyonu yoluyla ER homeostazını düzeltmektedir (90). Başka bir bileşik de, kardiyomiyositlerde GRP78, CHOP ve JNK

seviyelerini azaltarak ER stresini inhibe eden *Aralia elata*'dan türetilen bir terpenoid olan elatosiddir (91). Turpgillerden elde edilen sülforafan, sirtuin 1 aktivasyonu yoluyla ER stresini inhibe etmektedir. Sirtuin 1, PERK-eIF2 $\alpha$  aktivasyonunu azaltarak ER stresini inhibe eder (92). Bir başka bileşik ise bir alkaloid olan berberindir. Berberinin, kalp dokularında PERK-eIF2 $\alpha$  oluşumunu, ATF4 ve CHOP ekspresyonunu baskılayarak ER stresini azalttığı bulunmuştur (93). Bu bileşiklere ek olarak, ER homeostazını sürdürme potansiyeline sahip birçok bitki türevi bileşikler vardır. Klinik öncesi ve klinik çalışmalar, UPR ile ilişkili strese karşı çok sayıda küçük moleküler modülatör ve regülatörlerin, metabolik sendrom belirtilerine karşı ciddi terapötik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (94).

### 2.5.1. 7,8-Dihidroksiflavon

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, sinaptik plastisite, nöronların hayatta kalması, gelişimi ve farklılaşmasında önemli rol oynayan nörotrofin ailesinin bir üyesidir. BDNF, aynı kökenli reseptörü olan TrkB'ye bağlanarak TrkB otofosforilasyonunu tetikler, bu da PI3K/Akt, Ras/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) ve fosfolipaz C (PLC $\gamma$ )/protein kinaz C (PKC) gibi çeşitli sinyal yollarının aktivasyonuna yol açar (95, 96). Sinir sistemi üzerindeki temel etkisinin yanı sıra, BDNF yiyecek alım regülasyonu ve vücut kilo kontrolünde de etkilidir. Birçok çalışma leptin, insülin ve pankreatik polipeptid gibi iştah kontrolünde yer alan hormonların, BDNF yoluyla potansiyel olarak anoreksijenik etkiler sergilediğini göstermiştir (97). BDNF'nin glukoz ve lipid metabolizmasını düzenlediği ve obez diyabetik farelerde enerji homeostazını kontrol ettiği gösterilmiştir (98, 99). Beyin, periferik dokular ve dolaşımdaki BDNF seviyesinin düşük olduğu BDNF heterozigot farelerin (BDNF+/-), yabanıl farelere (wild tip) kıyasla artmış plazma glukoz, insülin ve leptin seviyesinin yanı sıra, artmış vücut ağırlığına sahip oldukları bulunmuştur (8, 9). T2D'li ve obez bireylerde de BDNF plazma seviyesinin düştüğü gösterilmiştir (100). BDNF'nin enerji harcamasını arttırabileceği, sistemik glukoz dengesini iyileştirebileceği ve insülin duyarlılığını arttırabileceği birlikte ele alındığında, T2D'nin önlenmesinde ve yönetiminde BDNF'nin yararlı etkileri olabileceği sonucuna varılmıştır (101). Ancak kısa yarılanma ömrü (<10 dakika) ve büyük boyutu (27 kDa) nedeniyle kan-beyin bariyerini geçememesi yüzünden BDNF'nin terapötik potansiyeli sınırlıdır (102). Bu eksiklikleri gidermek için araştırmacılar iki farklı yöntem geliştirmişlerdir: BDNF'nin dokulara girişini

kolaylaştırmak ve BDNF'nin gelişmiş farmakokinetik özelliklere sahip küçük moleköl analoglarını geliştirmek.

7,8-Dihidroksiflavon, doğal olarak oluşan, bitki ve sebzelerden izole edilen bir flavanoiddir. 7,8-DHF'nin, TrkB'nin spesifik agonisti olduğu ve BDNF mimetiği olarak güçlü nörotrofik etkilere sahip olduğu belgelenmiştir (7). 7,8-DHF'nin yüksek yağlı diyetle beslenen dişi farelerde, kas TrkB aktivasyonu ile vücut ağırlığını azalttığı gösterilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* modeller kullanarak yapılan çalışmada; 7,8-DHF tedavisinin, iskelet kasındaki uncoupling protein 1 ve AMPK ekspresyonunu arttırdığı ve bunun da sistemik enerji tüketiminin artmasına, adipozitenin azalmasına ve insülin duyarlılığının artmasına neden olduğu bulunmuştur (11). Diğer bir çalışmada ise yüksek yağlı diyetle obez yapılmış farelerde 7,8-DHF uygulamasının kas dokusunda hem mitokondriyal biyogenezi hem de mitokondriyal içeriği arttırdığı gösterilmiştir. Böylece obez hayvanlarda sistemik enerji tüketimi artmış ve vücut kilo alımı azalmıştır. Sonuç olarak, obez hayvanlarda hiperlipidemi, hiperglisemi, hiperinsülinemiye düzeltmiştir ve iskelet kası ve karaciğerde ektopik lipid birikimi azalmıştır (12).

BDNF'nin, nöronal ve endometriyal epitel hücrelerindeki ER stresine bağlı doku hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu dokularda ER stresi sırasında BDNF'nin CHOP/yh153 yolunu ve/veya kaspaz-12 aktivasyonunu baskılayarak apoptozu azalttığı gösterilmiştir (103). Cırrık ve ark. (104) yaptıkları bir çalışmada, bazal koşullarda BDNF eksikliğinin hepatik hücre ölümünü veya lipid birikimini etkilemediğini, bununla birlikte tunikamisin ile indüklenmiş ER stresi sırasında, BDNF nakavt gruplarda yabancı ırklara kıyasla artmış apoptoz, CHOP immün boyanması, SREBP-1c seviyesi ve steatoz bulmuşlardır. D-glukozla hasarlanmış ARPE-19 hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, 7,8-DHF'nin D-glukoz indüklü diyabetik apoptozu ve apoptotik bir faktör olan kaspaz 9'un protein ve mRNA seviyelerini azalttığı bulunmuştur (105). 7,8-DHF'nin iskemik HK-2 hücre canlılığını etkili bir şekilde artırabileceği, ER stresinin anahtar bir regülatörü olan CHOP ekspresyonunu bastırarak ER stresini azaltabileceği, buna ek olarak 7,8-DHF tedavisinin, CHOP ekspresyonunu baskılayan sistein açısından zengin protein 61'in ekspresyonunu da arttırdığı gösterilmiştir (106). Cho ve ark. yaptıkları diğer bir çalışmada ise, SH-SY5Y nöronal hücrelerini yüksek glukozla hasarlayarak 7,8-DHF'nin koruyucu etkisine bakmışlar ve 7,8-DHF'nin süperoksit anyon ve hidroksil radikalini süpürdüğünü, yüksek glukozun SH-SY5Y nöronal hücrelerinde mitokondriyal depolarizasyona neden

olduğunu; ancak, 7,8-DHF'nin bunu düzelttiğini bulmuşlardır. Ayrıca 7,8-DHF'nin etkili bir şekilde, pro-apoptotik protein (Bax) ve anti-apoptotik protein (Bcl-2)'nin ekspresyonunu düzenleyerek kaspaz sinyalizasyon yollarını inhibe ettiğini de göstermişlerdir (107). Son zamanlarda yapılan başka bir çalışmada, yüksek yağlı diyetle ve etanolle beslenen sıçanlarda oluşan oksidatif stres ve inflamasyona karşı 7,8-DHF'nin koruyucu etkisi ortaya konulmuştur. Bu etkisini lipid peroksidasyonunu azaltarak ve azalmış glutatyon seviyesini artırarak gerçekleştirmiştir. Ayrıca 7,8-DHF, IL-1 $\beta$  seviyelerini de azaltmıştır (108). Her ne kadar 7,8-DHF'nin *in vitro* çalışmalarda oksidatif ve ER stresine karşı olası koruyucu etkileri ortaya konulmuş olsa da, bu konu hakkında *in vivo* ortamda yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır.





### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Bu tez çalışması süresince laboratuvarımızda kullanılan cihazlar ve malzemeler üretici firmaları ile Tablo 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Kullanılan cihazlar ve malzemeleri

| Cihazlar ve Malzemeleri        | Üretici Firma                  |
|--------------------------------|--------------------------------|
| Derin Dondurucu (-80°C)        | New Brunswick Scientific       |
| Hassas analitik terazi         | Mettler Toledo AB204-S         |
| Real-Time PCR cihazı           | Roche LightCycler 480 II       |
| Mikrosantrifüj                 | Thermo IEC Micromax            |
| Saf Su Arıtma Cihazı           | Purelab Classic DV 25          |
| Santrifüj                      | Eppendorf, Centrifuge 5810     |
| Soğutmalı santrifüj            | Beckman-Coulter                |
| Sonikatör                      | Sonics Vibra Cell              |
| PCR cihazı                     | Applied Biosystems GeneAmp9700 |
| Çalkalayıcı inkübatör          | ShelLab/Sheldon S14-2          |
| Otoklav                        | Tuttnauer 3150 ELV             |
| Mikro hacimli spektrofotometre | Thermo Nanodrop 2000           |
| El homojenizatörü              | Ultra-Turrax T25               |
| Otomatik mikrotom              | Leica RM 2255                  |
| Mikroskop                      | Olympus BX51                   |
| Kamera ataçmanı                | Olympus DP71                   |

**Tablo 1. (Devam)**

| <b>Kullanılan Cihazlar ve Malzemeleri</b> | <b>Üretici Firma</b>         |
|-------------------------------------------|------------------------------|
| Mikropleyt Okuyucu                        | VERSA Max Molecular Devices  |
| Havalandırılmalı Kafes Sistemi            | RAIR IsoSystem               |
| Biyokimya Tüpleri                         | BD Vacutainer                |
| Glukometre                                | Vital Plus G 400             |
| Glukoz Ölçüm Stripleri                    | Vital Plus G 400             |
| LightCycler 480 Kaplama Folyosu           | Roche                        |
| LightCycler® 480 96'lık Pleyt             | Roche                        |
| Jel Görüntüleme Sistemi                   | Gel Logic 200 Imaging System |
| Elektroforez Güç Kaynağı                  | Thermo EC250-90              |

### **3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Çalışmada süresince kullanılan ticari kitler ve kimyasal maddeler üretici firmaları ile Tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Kullanılan ticari kitler, kimyasal maddeler ve üretici firmaları

| <b>Ticari Kitler ve kimyasal maddeler</b>     | <b>Üretici Firma</b>                |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------|
| GRP78 ELISA kiti                              | Aviva, Cat No:OKEH07000             |
| CHOP ELISA kiti                               | Aviva, Cat No:OKCD02491             |
| İnsülin ELISA kiti                            | Cyrstal Chem, Cat No:90080          |
| IL-1 $\beta$ ELISA kiti                       | Elabscience, Cat No:E-EL-M0037      |
| cDNA sentez kiti                              | Roche -REF 04896866001              |
| TriPure izolasyon reaktifi                    | Roche -REF 11667157001              |
| LC® FS DNAMaster SYBR Green I                 | Roche -REF 12239264001              |
| <i>In Situ</i> Hücre Ölümü Belirleme Kiti     | Roche- REF 11684817910              |
| 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Geliştirilmiş Sıvı |                                     |
| Substrat Sistemi Tetrahidroklorür             | Sigma, Cat No:D3939                 |
| Pierce™ BCA Protein Çalışma Kiti              | Thermo Scientific, Cat No: UD282967 |
| Dietil prikarbonat (DEPC)                     | Sigma                               |
| Etanol                                        | Sigma                               |
| 2-propanol                                    | Tekkim                              |
| Kloroform                                     | Merck                               |
| Agaroz                                        | Sigma                               |
| Etidyum Bromür                                | Sigma                               |
| Glukoz                                        | Sigma                               |
| 7,8-Dihidroksiflavon                          | Cayman                              |
| PBS Tablet                                    | Thermo Fisher                       |
| Bovin Serum Albumin (BSA)                     | Sigma                               |
| Tris Baz                                      | Sigma                               |
| Etilendiamin tetraasetik (EDTA)               | Sigma                               |
| Asetik Asit                                   | Sigma                               |
| Formaldehit                                   | Sigma                               |
| Hematoksilen&Eozin (H&E) boyası               | Sigma                               |

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında yürütülen TDK-2020-8738 kodlu ve " 7,8-Dihidroksiflavonun Kafeterya Diyeti ile Uyarılmış Metabolik Sendromda Pankreas ve Karaciger Dokularındaki

Endoplazmik Retikulum Stresine Etkisinin İncelenmesi" başlıklı KTÜ Bilimsel Araştırma Projesi (BAP06) ile desteklenmiştir. Etik kurul onayı KTÜ Tıp Fakültesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'ndan 05.09.2019 tarihli, 2019/37 protokol numaralı karar ile alınmıştır (Bkz. Ek 1 Etik Kurul Onayı).

### 3.2. Kullanılan Deney Hayvanları ve Uygulanan Prosedür

Deneyde kullanılan C57BL/6 ırkı fareler halihazırda üretildikleri ve beslendikleri KTÜ Tıp Fakültesi, Cerrahi Araştırma Merkezi'nden alındı. Çalışmada 17-20 gr ağırlığında 4-5 haftalık erkek fareler kullanıldı. Fareler aynı laboratuvarında 12 saatlik karanlık-aydınlık ortam sağlandı. Yem ve suya sınırsız erişim sağlanarak, ayrı ayrı havalandırılmalı fare kafeslerinde (RAIR IsoSystem, Seaford, DE ABD) barındırılıp beslenmeye başlandı. Her birinde 10 fare olacak şekilde 4 grup oluşturuldu.

- **Kontrol (K)** (n=10): 16 hafta boyunca kemirgen diyeti ile beslendi.
- **Kafeterya Diyeti (KD)** (n=10): 16 hafta boyunca kafeterya diyeti ile beslendi.
- **Kafeterya Diyeti+7,8-DHF (7,8-DHF)** (n=10) : 16 hafta boyunca kafeterya diyeti ile beslendi. Beslenme periyodunun son 28 günü intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon ile 5mg/kg/gün 7,8-DHF verildi. 7,8-DHF (5mg/kg), %17 dimetil sülfoksit (DMSO) içeren PBS ile çözülerek hazırlandı (108).
- **Kafeterya Diyeti+Çözücü (DMSO)** (n=10): 16 hafta boyunca kafeterya diyeti ile beslendi. Beslenme periyodunun son 28 günü i.p. enjeksiyon ile çözücü (%17 DMSO içeren PBS )verildi.

Kullanılacak kafeterya diyeti daha önce yapılan çalışmalardaki (5, 45, 109) diyetler modifiye edilerek hazırlandı ve kemirgen diyeti ilave edilerek kullanıldı (%30 kemirgen diyet ve %70 KD) (Tablo 3). Kemirgen diyetin kafeterya diyetine ilave edilmesiyle de; vitamin, mineral ve eser elementlerden oldukça yoksun olan kafeterya diyetinde, farelerin metabolizmaları bu durumdan etkilenmemiş oldu. Alınan enerjinin hesaplanmasında kullanılan gıda maddelerinin ambalajlarında belirtilen enerji değerleri esas alınarak %40'ı yağlardan, %55'i karbohidratlardan ve %5'i de proteinden gelecek şekilde diyet ayarlaması yapıldı.

**Tablo 3.** Kafeterya diyetini oluşturan ürünler ve enerji değerleri (100 g için)

|                   | <b>Enerji (kcal)</b> | <b>Karbohidrat(g)</b> | <b>Yağ(g)</b> | <b>Protein(g)</b> |
|-------------------|----------------------|-----------------------|---------------|-------------------|
| Fındıklı bisküvi  | 470                  | 64.2                  | 19.5          | 7.8               |
| Balık kraker      | 484                  | 63                    | 22            | 6.5               |
| Meyveli kek       | 378                  | 56                    | 14.9          | 4.2               |
| Patates cipsi     | 509.8                | 55.2                  | 29.7          | 7.6               |
| Çikolatalı gofret | 517                  | 63.1                  | 26.9          | 5.8               |

Deneyde kullanılacak abur cuburlardan, fındıklı bisküvi 100 g, balık kraker 160 g, meyveli kek 220 g, patates cipsi 150 g ve çikolatalı gofret 40 g'lık paketlerde bulunmaktadır. Kullanılan “abur cubur” malzemelerin yaklaşık 4600 kcal/kg enerjiye sahip olması için iki paket fındıklı bisküvi, 1.75 paket balık kraker, bir paket meyveli kek, bir paket patates cipsi ve dört paket çikolatalı gofret kullanıldı. Toplam ağırlık yaklaşık 1010 g oldu. Paketlerin arkasındaki değerleri kullanarak bir kilo içinde ne kadar yağ, karbohidrat ve protein olduğu hesaplandı. Bir kilo yem oluşturmak için kullanılan bu “abur cubur” malzemelerinde 220.9 g yağ, 611.76 g karbohidrat ve 63.72 g protein bulunmaktaydı. Bir g yağ yakıldığında 9 kcal, bir g protein ve karbohidrat yakıldığında ise 4 kcal enerji açığa çıkacağı için, kullanılan malzemelerden açığa çıkacak enerji değeri yağlar için  $(220.9 \times 9)$  1988.73 kcal, karbohidratlar için  $(611.76 \times 4)$  2447.04 kcal ve proteinler için  $(63.72 \times 4)$  254.88 kcal'di. Toplam enerji değeri ise 4690.65 kcal/kg'dı. Bir fare ortalama 4 g yem tüketmektedir. Bu nedenle 16 hafta boyunca 30 adet fare (KD grupları) yaklaşık 17.47 kg yem tüketmektedir (110). Yem oluştururken %30 kemirgen yemi ve %70 “abur cubur” malzemeleri kullanıldı. Deneme aşamalarını da düşünerek 24.585 kg'lık bir KD hazırlandı. Bunun 17.210 kg'ı “abur cubur”, 7.375 kg'ı kemirgen yeminden oluştu. 17.210 kg “abur cubur” oluşturmak için 34 paket fındıklı bisküvi, 30 paket balık kraker, 17 paket meyveli kek, 17 paket patates cipsi ve 68 paket çikolatalı gofret kullanıldı. Kısaca bu “abur cubur” malzemeler ve kemir yemi laboratuvarında bulunan laboratuvar tipi öğütücü değirmen (Retsch ZM 200) ile öğütülüp birbirine karıştırıldı. Bu toz karışım az miktar musluk suyu ile bulamaç haline getirildi ve kalıplara basıldı. Kalıplar daha sonra 50°C'de 24 saat etüvde bekletildi ve kurutuldu.

Yemlerin yumuşamamasına ve sert kalmasına dikkat edildi. Bu nedenle hazırlanan yemler +4°C’de bekletildi ve kalıba basılan yemler bittikçe toz karışımdan yenileri hazırlandı.

16 haftalık diyet programı boyunca farelerin 15 günde bir kiloları tartıldı ve kayıt altına alındı. Diyet protokolü sonunda hayvanlar dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Kanları biyokimya tüplerine alındı, pıhtılaşmaları sağlandı ve ardından 1000 xg’de santrifüj edildi. Serumlar elde edildi ve analiz gününe kadar -80°C’de saklandı. Farelerin karaciğer ve pankreas dokuları çıkarıldı. Dokuların bir bölümü histopatolojik incelemeler için %10’luk formaldehide konuldu ve çalışmayı yapacak araştırmacıya teslim edildi. Bir kısmı da ELISA ve RT-PCR çalışması için ayrı ayrı tüplere konuldu ve sıvı azotta hemen donduruldu. Ekspresyon çalışmaları için karaciğer ve pankreas dokularında aynı gün RNA izolasyonu yapıp, cDNA’ya dönüştürüldü ve -80°C’de saklandı. Epididimal yağ dokusu (EYD) çıkartılıp tartıldı. Merkezi obezitenin bir parametresi olan %adiposite indeksi hesaplandı ((EYD(g)/total vücut ağırlığı(g))\*100) (111). EYD’nin bir parçası histopatolojik incelemeler için ayrıldı.

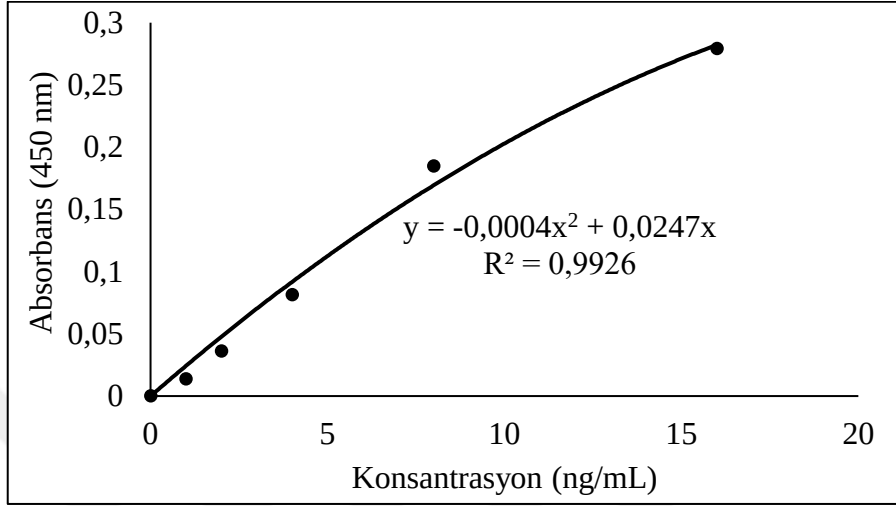
### **3.3. Serum Biyokimya Parametrelerinin Ölçümü**

Farelerden elde edilen serum numunelerinde pankreas fonksiyonları açısından amilaz, karaciğer fonksiyonlarını açısından aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve genel metabolik durumu değerlendirmek için glukoz, trigliserid ve kolesterol seviyeleri KTÜ Farabi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı’nda halihazırda kullanılan Beckman Coulter Analyzer AU 5800 (Kaliforniya, ABD) otoanalizörü yardımıyla belirlendi. Otoanalizörde amilaz ölçümü bloke maltoheptaosit, AST ve ALT ölçümü UV, glukoz ölçümü heksokinaz, kolesterol ölçümü kolesterol oksidaz ve trigliserid ölçümü gliserol oksidaz yöntemi ile belirlendi. Amilaz, trigliserid, kolesterol ve glukoz değerleri mg/dL, ALT ve AST değerleri ise U/L olarak ifade edildi.

### **3.4. Serum İnsülin Seviyesinin Ölçümü**

12 saatlik açık sonrasında farelerden elde edilen serum örneklerinde insülin seviyeleri, Crystal Chem (Illinois, ABD) firması tarafından üretilen 16MAUM1388 ürün kodlu, yüksek sensitiviteye sahip insülin ELISA kiti kullanılarak ölçüldü. Ölçümler üretici firmanın tavsiyesi doğrultusunda gerçekleştirildi. Kitin önerisiyle serum örnekleri çalışma için 20 kat dilüe edildi. Numune konsantrasyonları Şekil 2’deki standart grafiğine göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Ayrıca farelerde insülin direncinin gelişip gelişmediğini belirlemek için açlık glukoz ve insülin değerlerinden yararlanarak homeostatik model

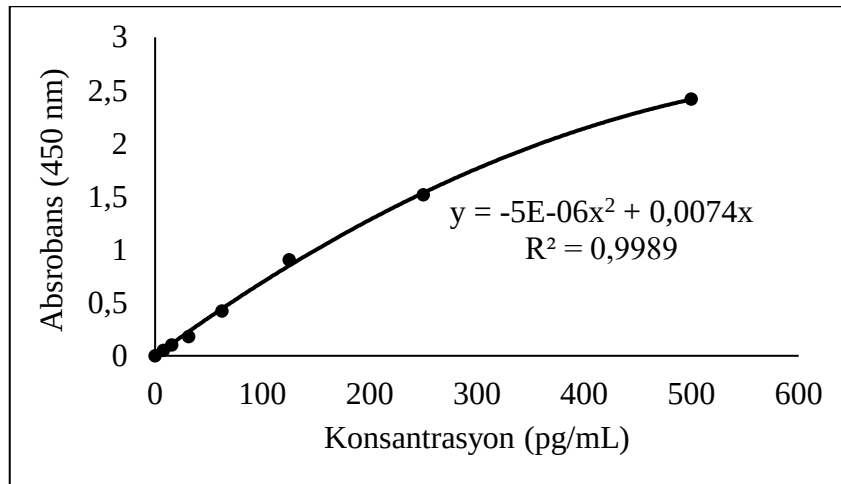
değerlendirme (HOMA) yöntemi ile HOMA-IR değeri hesaplandı ( $\text{HOMA-IR} = [\text{insülin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{açlık glukoz (mmol/L)}] / 22.5$ ) (112).



Şekil 2. İnsülin standart grafiği

### 3.5. Serum IL-1 $\beta$ Seviyesinin Ölçümü

Serum IL-1 $\beta$  seviyelerini belirlemek için Elabscience (Teksas, ABD) şirketinin E-EL-M0037 ürün kodlu IL-1 $\beta$  ticari ELISA kiti kullanıldı. Serumda IL-1 $\beta$  ölçümü üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda gerçekleştirildi. Numune konsantrasyonları Şekil 3'teki standart grafiğine göre pg/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 3. IL-1 $\beta$  Standart Grafiği

### 3.6. Oral Glukoz Tolerans Testi

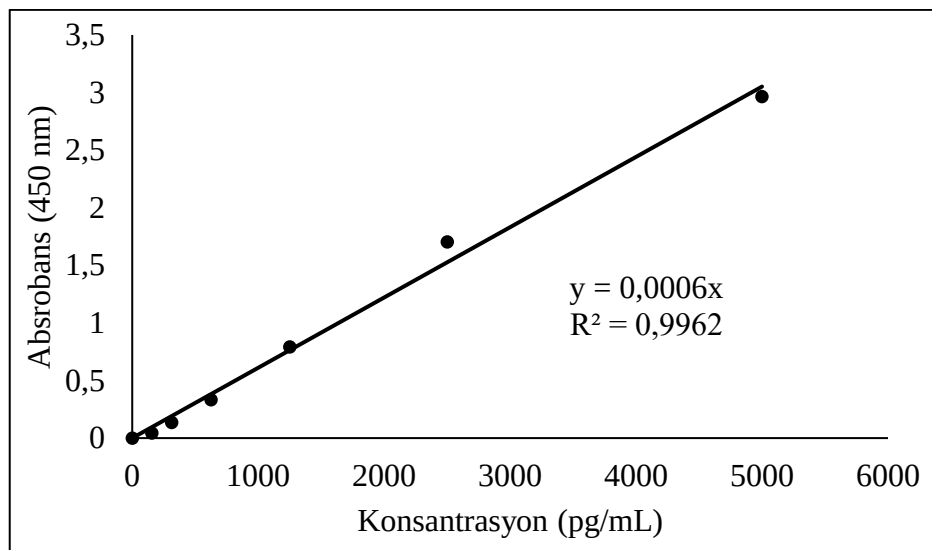
Beslenme periyodunun sonunda, karbohidrat metabolizmasını değerlendirmek için yine her bir gruptaki farelere OGTT yapıldı (113). OGTT işlemi için, fareler altı saat aç bırakıldı (07.00-13.00 h) ve açlık kan glukoz değerleri kuyruk veninden alınan kandan glukometre (Vital Plus G 400, Kore) yardımı ile ölçüldü. Daha sonra 2 g/kg glukoz gavaj (20 G) iğnesiyle verildi. Kan glukoz değerleri 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda glukometre ile ölçüldü.

### 3.7. Doku GRP78 ve CHOP Seviyelerinin Ölçümü

Karaciğer ve pankreas dokularının homojenizasyonu ELISA kit protokolüne göre gerçekleştirildi. Kısaca 100 mg doku 1mL 1X PBS ile homojenize edildi ve bir gece -20°C'de bekletildi. Daha sonra hücre membranlarını kırmak için iki kez dondur çöz işlemi yapıldı. Homojenatlar 5000 xg'de +4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlarda GRP78 ve CHOP ölçümleri ELISA protokolüne göre gerçekleştirildi.

#### 3.7.1. Doku GRP78 Seviyesinin Ölçümü

Karaciğer ve pankreas dokularında GRP78 seviyeleri Aviva System Biology (San Diego, ABD) firmasının ürettiği OKEH07000 katalog numaralı GRP78 ticari ELISA kiti kullanılarak belirlendi. Numune konsantrasyonları Şekil 4'teki standart grafiğine göre pg/mL cinsinden hesaplandı. Sonuçlar pg/mg protein olarak gösterildi.

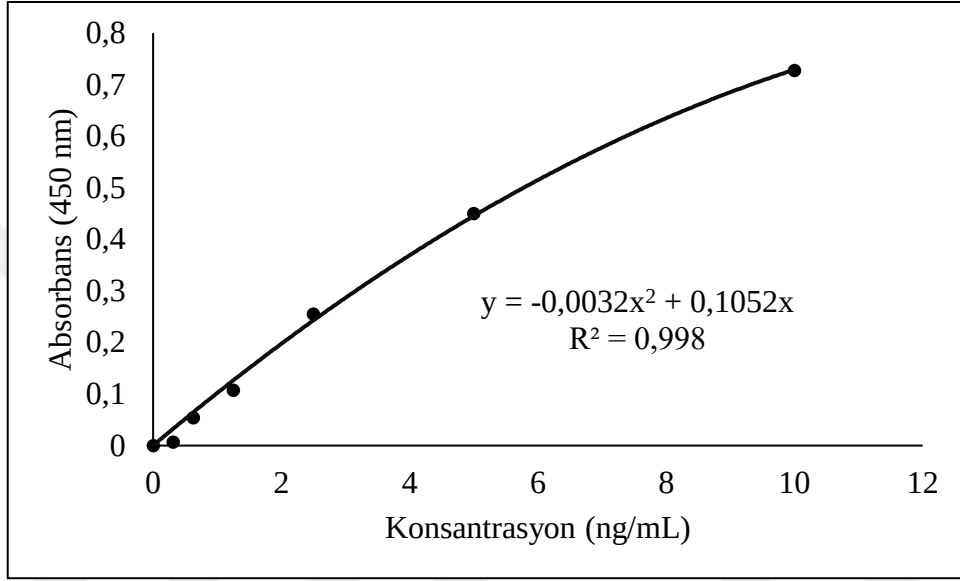


Şekil 4. GRP78 standart grafiği



### 3.7.2. Doku CHOP Seviyesinin Ölçümü

Karaciğer ve pankreas doku CHOP seviyeleri Aviva System Biology (San Diego, USA) firmasının ürettiği OKCD02491 katalog numaralı CHOP ELISA kiti kullanılarak belirlendi. Numune konsantrasyonları Şekil 5'teki standart grafiğine göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Sonuçlar ng/mg protein ifade edildi.



Şekil 5. CHOP standart grafiği

### 3.8. Karaciğer Triglicerid Seviyelerinin Ölçümü

Fare karaciğer dokusunda trigliserid ölçümü Choi (114) ve Mopuri'nin (115) geliştirdikleri metodların modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. Kısaca 25 mg karaciğer dokusu tartıldı ve üzerine 500 µL 1 M NaCl çözeltisi eklendi. Daha sonra el homojenizatörü (Omni Tissue Master 125, Kennesaw GA, USA) ile homojenize edildi. Üzerine 3 mL kloroform/metanol (2:1) eklendi ve oda sıcaklığında çalkalayıcıda bir gece inkübasyona bırakıldı. Homojenat 3000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Lipid içeren alt organik faz yeni bir tüpe aktarıldı. 50°C'de etüvde fazla sıvı uçuruldu. Pelleti çözmek için %2 triton X-100 içeren 1M NaCl çözeltisinden 200 µL eklendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra 5 saniye boyunca 3 kere sonifikasyon (Sonics Vibra Cell, Connecticut, ABD) yapıldı. Elde edilen çözeltide trigliserid miktarı otoanalizörde (Beckman Coulter Analyzer AU 5800, Kaliforniya, USA) ölçüldü. Sonuçlar g protein başına verildi.

### 3.9. Protein Miktar Tayini

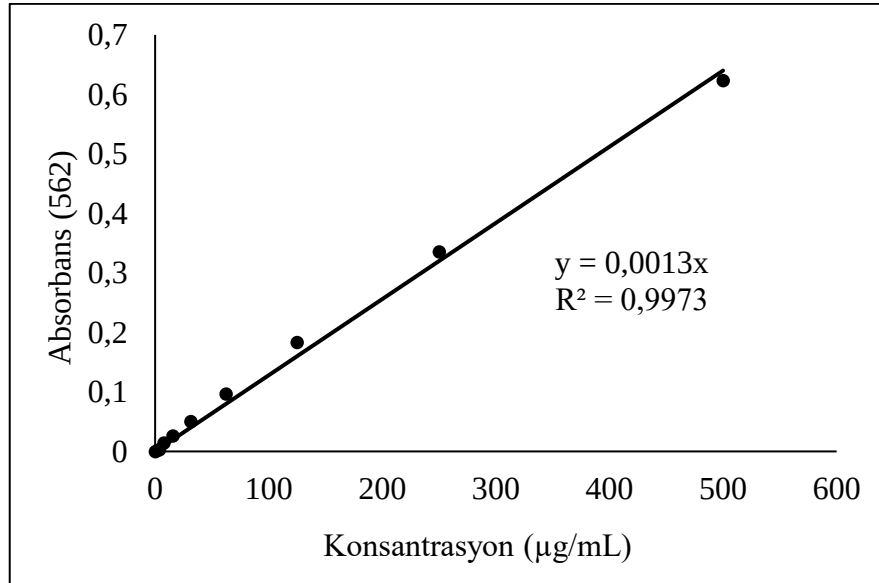
Karaciğer ve pankreas dokularından elde edilen süpernatantlarda protein miktarını belirlemek için, UD282967 katalog numaralı (Pierce<sup>™</sup> Thermo Scientific, USA) Bikinkoninik Asit (BCA) protein çalışma kiti kullanıldı. Ölçümler üretci firmanın tavsiyeleri doğrultusunda gerçekleştirildi.

#### Çözeltilerin Hazırlanması:

**1. BCA çalışma reaktifi:** BCA çalışma reaktifini oluşturmak için kitin içerisinde bulunan %4'lük bakır (II) sülfat ve BCA çalışma çözeltisi 50:1 oranında karıştırıldı. Gerekli hacim örnek sayısına göre hesaplandı.

**2. BSA standardının hazırlanması:** 2 mg/mL'lik BSA standardı hazırlamak için 10 mg BSA tartıldı ve 5 mL saf suda çözöldü. Elde edilen stok stok çözeltiden seri dilüsyonla farklı konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı.

Ölçüm için her bir kuyucuğa 25'er µL standart veya örnek yüklendi. Üzerine 200 µL BCA çalışma reaktifi ilave edildi. Daha sonra 30 saniye iyice karıştırıldı ve üzeri folyoyla kapatıldı. 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra 562 nm'de ölçüm yapıldı. Sonuçlar µg/mL cinsinden hesaplandı. GRP78 ve CHOP ölçümünde protein miktarı hesaplaması için kullanılan protein standart grafiği Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. Protein standart grafiği

### 3.10. Gen Ekspresyonu Analizleri

#### 3.10.1. Dietilpirokarbonatlı Suyun Hazırlanışı

Karaciğer ve pankreas dokularında RNA izolasyonu yapmadan önce olası RNA kaybını önlemek için dietilpirokarbonatlı (DEPC) su hazırlandı. Hazırlanan su ile birlikte dokuların kesilmesi ve çıkartılması gibi işlemlerde kullanılan bütün malzemeler yıkandı. Böyle RNA kaybı en aza indirgenmiş oldu. Bu amaçla %97'lik stok DEPC'den %0.1 (v/v)'lik 500 mL DEPC'li su hazırlandı. Hazırlanan su 2 saat 37<sup>0</sup>C'de inkübasyona bırakıldı ve ardından 20 dakika boyunca otoklavlandı. Elde edilen su soğuduktan sonra ışıktan bozunmasını engellemek için folyayla sarıldı ve +4<sup>0</sup>C'de saklandı.

#### 3.10.2 Karaciğer ve Pankreas Dokularından Total RNA İzolasyonu

Karaciğer ve pankreas dokularında RNA izolasyonu TriPure izolasyon reaktifi (Roche, İsviçre) kullanılarak reaktif içinde bulunan prodesüre uygun olarak aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

- 50-100 mg doku tartılıp 2 mL'lik DNaz/RNaz'dan yoksun tüplere konuldu. Bir mL TriPure izolasyon reaktifi eklendi ve el homojenizatörü ile 30 saniye boyunca homojenize edildi.
- Nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrıştığından emin olmak için homojenize edilen örnekler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra tüplerin üzerine 0.2 mL kloroform eklendi ve 15 saniye kuvvetlice çalkalandı. Örnekler oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- Çözeltiyi üç faza ayırmak için tüpler 12.000 xg'de +4<sup>0</sup>C'de 15 dakika santrifüj edildi.
- En üstteki renksiz veya hafif pembe renkli faz alınıp DNaz/RNaz'dan yoksun yeni bir reaksiyon tüpüne konuldu. Bu fazda aradığımız RNA bulunmaktadır.
- Tüplerin üzerine 0.5 mL izopropil alkol (2-propanol) eklendi. Birkaç kez alt üst edilip iyice karışması sağlandı. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilip RNA çökeleğinin oluşması sağlandı.
- Tüpler 12.000 xg'de +4<sup>0</sup>C'de 10 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant (üst sulu faz) atıldı. RNA pelleti tüpün alt kısmında kaldı.

- Tüplerin üzerine %75'lik 1 mL etanol ilave edildi. Vorteklenerek RNA'nın yıkanması sağlandı. RNA çökeleği %75'lik etanol içinde istenirse (+2)-(+8)<sup>0</sup>C değerleri arasında bir hafta, (-15)-(-25)<sup>0</sup>C değerleri arasında ise en az bir yıl saklanabilir.
- Örnekler 7.500 xg'de +4<sup>0</sup>C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın tamamen atıldığından emin olundu. Fazla etanolün uçması için tüplerin kapakları açılıp etanolün uçması sağlandı.
- RNA pelletleri 50 µL DEPC ile muamele edilmiş RNaz'dan yoksun su ile pipetaj yapılarak çözüldü (eğer fazla pellet varsa bu hacim arttırılabilir). Pelletin tamamen çözünmesi sağlandı.
- Çözelti 55<sup>0</sup>C'de 15 dakika inkübe edildi.
- Karaciğer ve pankreas dokularından elde edilen total RNA'ların konsantrasyonları ve saflığın bir göstergesi A260/A280 oranı NanoDrop kullanılarak belirlendi. İzole edilen örnekler DEPC ile muamele edilmiş RNaz'dan yoksun su ile çözüldüğü için ölçümde bu çözelti kör olarak kullanıldı.
- Daha sonra elde edilen RNA örnekleri agaroz jel elektroforezi yardımıyla görüntülendi.

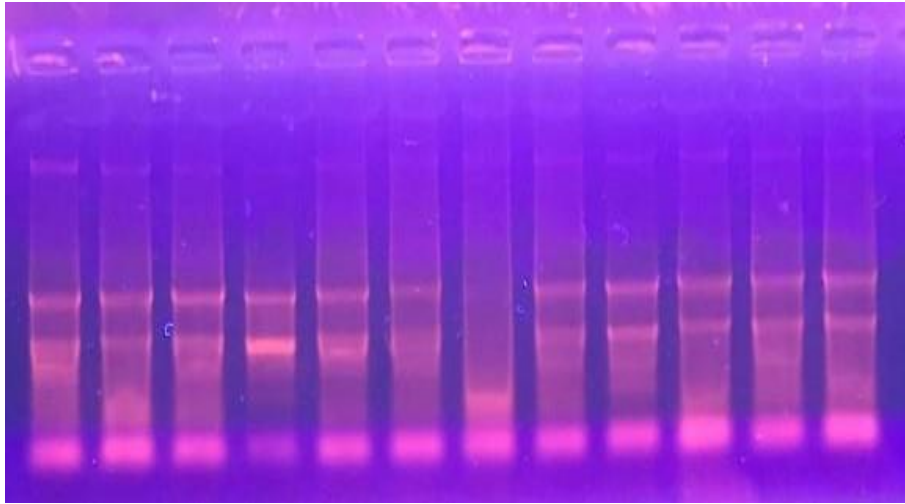
### 3.10.3. Agaroz Jel Elektroforezi

**1. 50x Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) tamponu hazırlanması:** 242 g Tris, 29.224 g Na<sub>2</sub>EDTA tarıldı ve bir erlene aktarıldı. Daha sonra üzerine 800 mL saf suda ilave edildi ve iyice çözünmesi sağlandı. Çözünmeden sonra karışıma 57.1 mL glasiyel asetik asit ilave edildi ve NaOH ile pH'sı 8.5'e ayarlandı. pH ayarlaması yapmak için çok fazla NaOH çözeltisine ihtiyaç olabiliyor. Bu nedenle katı NaOH pelletleri ile pH ayarlaması yapmak daha kolay olmaktadır. pH ayarlaması yaptıktan sonra son hacim bir litreye tamamlandı. 50x'lik TAE tamponu 1x'e seyreltilerek hem elektroforez tamponu olarak hem de agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.

**2. Etidyum Bromür Çözeltisi:** Saf su ile 10 mg/mL'lik etidyum bromür hazırlandı. Etidyum bromür karsinojen ve mutajen olduğu bu aşamada çift kat eldiven kullanıldı ve kullanılan mazlemelerin temizliğine dikkat edildi. Hazırlanan çözelti folyoyla kaplanarak 4<sup>0</sup>C'de saklandı.

**3. %0.8'lik agaroz jel hazırlanması:** 0.4 g agaroz tartıldı ve 250 ml'lik bir erlene aktarıldı. Üzerine 50 mL 1x TAE tamponu ilave edildi. Daha sonra karışım mikrodalga fırında bir dakika kaynatıldı ve agarozun çözünmesi sağlandı. Elde edilen jel musluk suyu yardımıyla soğutuldu, 10 µL etidyum bromür eklendi ve iyice karıştırıldı. Jelin tarakları yakmayacak ısıya düşmesini beklerken, taraklar jelin döküleceği kabın 1 ve 3 numaralı pozisyonuna yerleştirildi ve kabın kenarları jelin akmaması için bantla kapatıldı. Soğuyan jel yavaşça kaba döküldü. Bu aşamada kabarcık olmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 30 dakika kadar oda sıcaklığında jelin katılaşması bekledi. Jel tamamen katılaştıktan sonra taraklar ve etrafındaki bantlar çıkarıldı, jel elektroforez tankına yerleştirildi. Jel tanka yerleştirildikten sonra üzerini tamamen geçecek kadar 1x TAE tamponu ilave edildi. Tamponda kabarcık olmamasına dikkat edildi.

**4. Ürünlerin Jele Yüklmesi:** 10 µL RNA örneği üzerine 5 µL yükleme boyası eklendi ve iyice karıştırıldı. Karışımdan 10 µL alınarak kuyucuklara yüklendi. Elektroforez tankının bağlı olduğu güç tankı 100 volt, 300 mA ve 30 dakikaya ayarlandı. Ürünlerin jeldeki göçü sağlandı (Resim 1).



**Resim 1.** Elde edilen RNA örneklerinin jeldeki görüntüsü

#### 3.10.4. Total RNA'dan Komplementer DNA Sentezi

Karaciğer ve pankreas dokularından elde izole edilen RNA örneklerinde komplementer DNA (cDNA) sentezi 04 896 866 001 ürün kodlu Roche (İsviçre) marka “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis” kiti kullanıldı. Prosedür üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda gerçekleştirildi. İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezini gerçekleştirmek için aşağıda belirtilen adımlar takip edildi. Total RNA’lar DEPC ile muamele edilmiş RNaz’dan yoksun su ile seyreltilerek konsantrasyonu eşitlendi. cDNA sentezinde her bir örnek için Tablo 4’te gösterilen reaktifler kullanıldı.

**Tablo 4.** cDNA sentezinde bir örnek için gerekli reaktifler ve hacimleri

| Reaktifler                  | Hacim (μL) (1X için) |
|-----------------------------|----------------------|
| PCR saflığında su           | 1                    |
| Tampon                      | 4                    |
| RNaz İnhibitörü             | 0.5                  |
| dNTP Karışımı (10mM)        | 2                    |
| Random Hekzamer Primer      | 2                    |
| Ters Transkriptaz (20 U/μL) | 0.5                  |

cDNA sentezi için reaksiyon karışımı Tablo 4’e göre hazırlandı. Bu miktarlar bir örnek içindir. Örnek sayısına bağlı olarak hacimler hesaplandı. 10 μL RNA örneği üzerine 10 μL bu karışımdan eklendi. Tüpler kısa bir santrifüj edilip örnekle karışımın homejen karışması sağlandı. Daha sonra PCR cihazı 25°C’de 10 dakika, 55°C’de 30 dakika (iki tur olacak şekilde) ve 85°C’de 5 dakika olacak şekilde ayarlandı. Oluşan cDNA ürün konsantrasyonları (ng/μL) ve saflığı NanoDrop’ta belirlendi. Örnekler analiz gününe kadar -80°C’de saklandı. Gen ekspresyon analizleri yapılırken cDNA numune konsantrasyonları 100 ng/μL’ye seyreltildi.

### 3.10.5. RT-PCR Analizleri

RT-PCR, kullanılan floresan boyalar aracılığıyla çoğaltılan hedef DNA'nın gerçek zamanlı kantitatif tespitine imkan sağlayan bir metottur (116). Gen ekspresyon analizleri SYBR Green floresan boyası içeren (Roche, İsviçre) LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I kiti (REF: 12239264001) ile LightCycler® 480 II RT-PCR (Roche, İsviçre) cihazında gerçekleştirildi. Kit içerisinde 5 adet 1a ve 15 adet 1b isimli tüpler çıkmaktadır. Her 1a tüpü 3 adet 1b'ye yetecek kadar materyal içermektedir. Çalışma öncesinde tüpler spinlenip, 1a'dan 1b'ye 10 µl aktarıldı. 1a reaktifinden eklenen 1b tüpünün, diğer 1b'ler ile karışmasını önlemek için adı 1 olarak değiştirildi. Bu aşamada karışıklık olmasının önüne geçildi. Çalışmamızda kullandığımız primerler Tablo 5'te verilmiştir.

**Tablo 5.** RT-PCR'da kullanılan primer dizileri

| Primer Adı                     |              | Primer dizisi                         |
|--------------------------------|--------------|---------------------------------------|
| $\beta$ -Aktin ( <i>Actb</i> ) | İleri primer | 5'- CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C -3' |
|                                | Geri primer  | 5'- ACC GAT CCA CAC AGA GTA CTT G -3' |
| GRP78 ( <i>Hspa5</i> )         | İleri primer | 5'- AGA GCC TTG TCT TCT CAG CAT C -3' |
|                                | Geri primer  | 5'- CAA CAC TTT CTG GAC AGG CTT C -3' |
| CHOP ( <i>Ddit3</i> )          | İleri primer | 5'- CAA GCA TGA ACA GTG GGC ATC -3'   |
|                                | Geri primer  | 5'- TGT ACC GTC TAT GTG CAA GCC -3'   |

RT-PCR analizini gerçekleştirirken aşağıdaki adımlar izlendi:

- Gerekli reaksiyon ortamı hedef genler (GRP78 ve CHOP) ve referans gen ( $\beta$ -aktin) için ayrı ayrı olmak üzere Tablo 6'da gösterilen hacimler kullanılarak hazırlandı.

**Tablo 6.** Real Time PCR analizi için gerekli reaktifler ve hacimleri

| <b>Reaktif</b>                  | <b>Her bir örnek için gerekli hacim (µL)</b> |
|---------------------------------|----------------------------------------------|
| LC FS DNA Master SYBR           | 2                                            |
| MgCl <sub>2</sub>               | 1.6                                          |
| F primer (10 µM)                | 1                                            |
| R primer (10 µM)                | 1                                            |
| PCR Saflığında H <sub>2</sub> O | 9.4                                          |
| cDNA                            | 5                                            |
| <b>Total Hacim</b>              | <b>20</b>                                    |

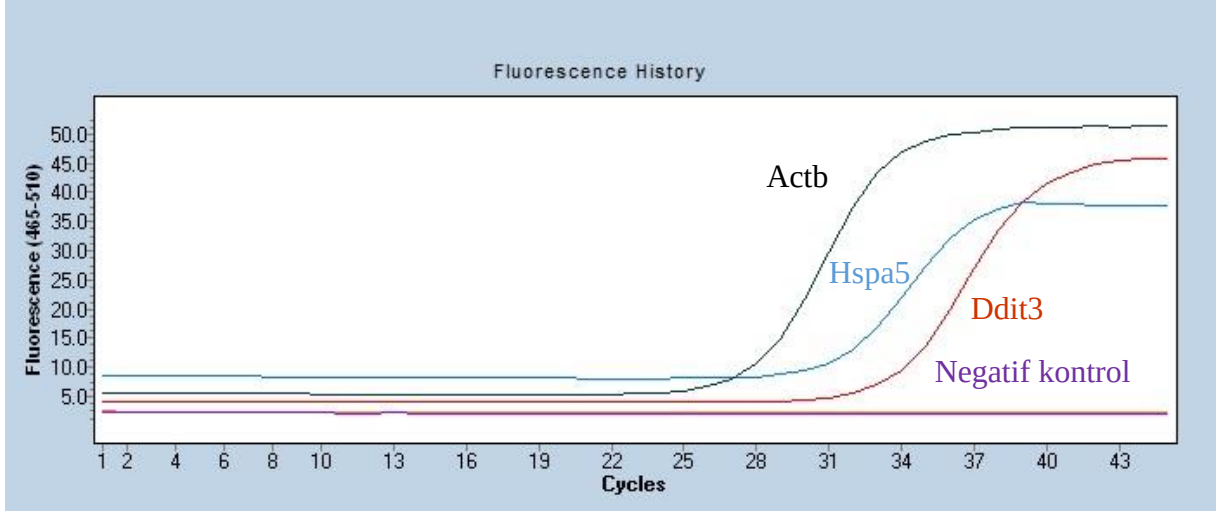
- Her bir örnek için hazırlanan karışımdan pleyte 15 µL eklendi ve üzerine 5 µL cDNA örneği ilave edildi. Örnekler ikili çalışıldı.
- Pleytin üzeri RT-PCR çalışmaları için üretilen ısıya dayanıklı folyoyla iyice kapatıldı. İyice yapışmasını sağlamak ve hava almasını önlemek için bir tarak yardımıyla üzerinden geçildi. Karışımın iyice karışmasını sağlamak için pleyt 1500xg'de 2 dakika santrifüj edilip cihaza yüklendi.
- Cihaz ayarları Tablo 7'de gösterilen protokole göre ayarlandı ve analizler gerçekleştirildi.



**Tablo 7.** RT-PCR protokolü

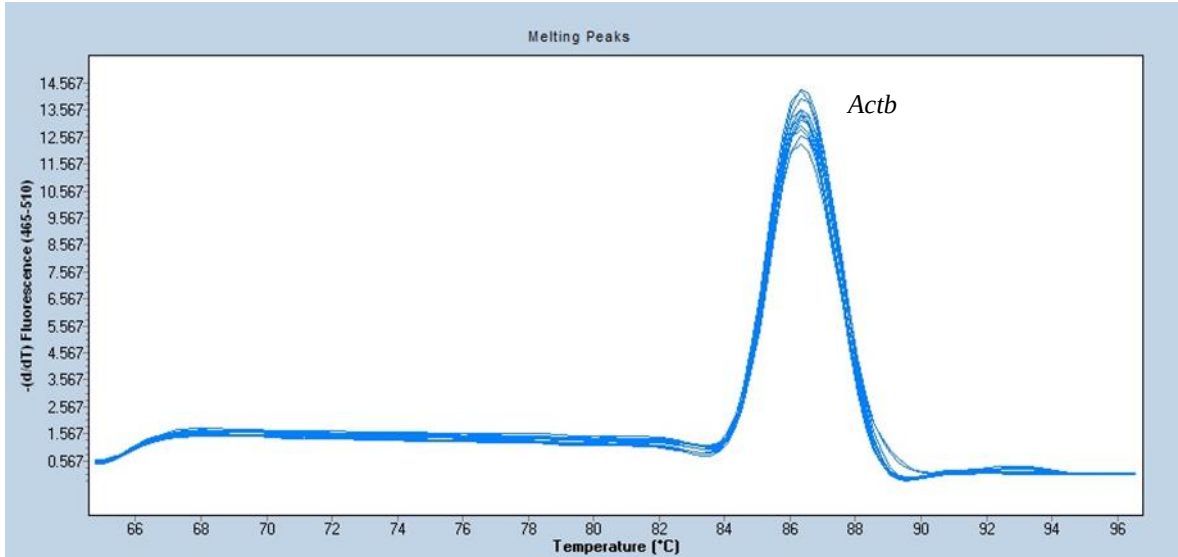
| Program             | Döngü          | Analiz Modu      |                        |
|---------------------|----------------|------------------|------------------------|
| Ön inkübasyon       | 1              | Yok              |                        |
| Amplifikasyon       | 45             | Miktar Tayini    |                        |
| Erime Eğrisi        | 1              | Erime Eğrisi     |                        |
| Soğutma             | 1              | Yok              |                        |
| Hedef Sıcaklık [°C) | Elde Etme Modu | Süre [saat:dk:s) | Sıcaklık Artışı [°C/s) |
| Ön inkübasyon       |                |                  |                        |
| 95                  | Yok            | 00:15:00         | 4.4                    |
| Amplifikasyon       |                |                  |                        |
| 95                  | Yok            | 00:00:10         | 4.4                    |
| 62                  | Yok            | 00:00:20         | 4.4                    |
| 72                  | Tek            | 00:00:20         | 4.4                    |
| Erime Eğrisi        |                |                  |                        |
| 95                  | Yok            | 00:00:00         | 4.4                    |
| 65                  | Yok            | 00:00:15         | 4.4                    |
| 95                  | Sürekli        | 00:00:00         | 4.4                    |
| Soğutma             |                |                  |                        |
| 40                  | Yok            | 00:00:10         | 4.4                    |

RT-PCR çalışması gerçekleştirilirken elde edilen amplifikasyon eğrilerinden biri Resim 2’de verilmiştir.

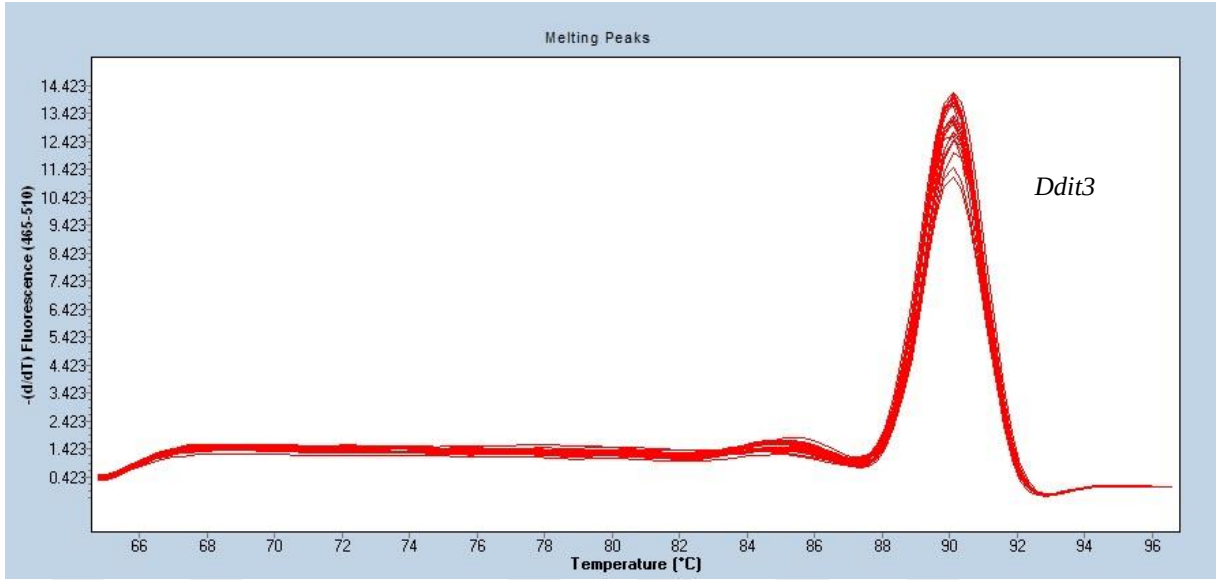


**Resim 2.** *Actb*, *Hspa5* ve *Ddit3* genlerine ait amplifikasyon eğrisi

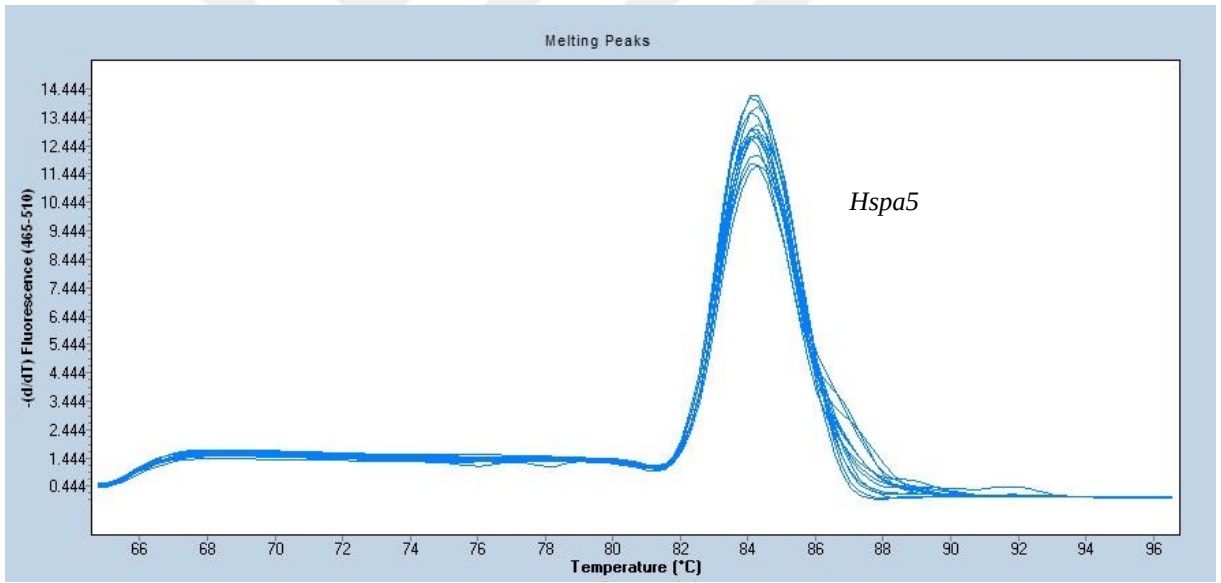
RT-PCR çalışmalarında elde edilen *Actb*, *Ddit3* ve *Hspa5* genlerine ait erime eğrisi grafiklerinden biri, örnek olarak Resim 3, 4 ve 5’te gösterilmiştir.



**Resim 3.** *Actb* genine ait erime eğrisi



**Resim 4.** *Ddit3* genine ait erime eğrisi



**Resim 5.** *Hspa5* genine ait erime eğrisi

### 3.10.5.1. Gen Ekspresyonu Çalışmalarının Analizi

Gerçek zamanlı kantitatif PCR çalışmalarında verileri analiz etmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden bazıları mutlak kantifikasyon ve göreceli kantifikasyon yöntemleridir. Gen ekspresyon çalışmalarında hesap yaparken  $2^{-\Delta\Delta C_p}$  yöntemi, en sık kullanılan yöntemlerden biridir (117). Analiz yapılırken her bir örneğin eksponansiyal faza geçtiği devir ( $C_p$ , crossing point) tespit edilerek  $2^{-\Delta\Delta C_p}$  formülde yerine koyuldu. Kontrol grubuna göre diğer gruplardaki genlerin seviyelerinde kaç kat değişim olduğu kat değişim formülü yardımı ile hesaplandı (kat değişim= $2^{-\Delta\Delta C_p} = 2^{-(\Delta C_p \text{ hedef}-\Delta C_p \text{ kontrol})}$ ).

### 3.11. Histopatolojik Analizler

#### 3.11.1. Karaciğer, Pankreas ve Yağ Dokularının Histopatolojik Değerlendirilmesi

Çalışma sonrasında gruplardan alınan karaciğer, pankreas ve yağ dokusu örneklerinde ışık mikroskopisinde inceleme yapmak için örnekler %10'luk formaldehit çözeltisi içine alındı ve 48 saat fikse edildi. Örnekler parafin bloklara gömüldü ve ışık mikroskopik yöntemler için tam otomatik mikrotom (Leica RM 2255, Tokyo, Japan) ile 4-5  $\mu$ m kalınlığında kesitler lam üzerine alındı. Elde edilen kesitler, dokuların genel histolojik yapısını değerlendirmek suretiyle Hematoksilen&Eozin (H&E) boyası ile boyandı. Preparatlar incelenirken Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) mikroskobu kullanıldı. Elde edilen bulgular ışık mikroskobuna bağlantılı kamera ataçmanı (Olympus DP71; Olympus, Tokyo, Japan) ile fotoğraflandı. Pankreas değerlendirilirken, H&E boyama ile pankreasın genel histolojik yapısı ve adacık morfolojisi değerlendirildi. Bu amaçla pankreasta vasküler konjesyon, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ödem açısından incelemeler yapıldı. Işık mikroskobu altında her bir kesitte farklı bölgelerden çekilen en az 10 imaj üzerinde yapılan analizin ortalaması alınarak gruplar arası fark araştırıldı (118). Karaciğere ait dokularının histopatolojik değerlendirmesinde; karaciğer kesitleri hepatosit dejenerasyonu, vasküler konjesyon, sinüzoidal dilatasyon, genişlemiş sinüzoidlerde konjesyon açısından yarı kantitatif olarak değerlendirildi (119). Değerlendirmede 0=yok, 1=hafif, 2=orta, 3=şiddetli olarak yarı kantitatif değerlendirme yapıldı. Yağ dokularının değerlendirmesinde, yağ hücrelerinin boyutları ve yağ hücreleri arası histopatolojik olarak değerlendirildi. Yağ dokusu için her deney grubuna ait 10 görüntü 10X objektif kullanılarak fotoğraflandı (120).

### 3.11.2. İmmünohistokimyasal İşlemler

Karaciğer ve pankreas dokularında apoptozu değerlendirmek amacıyla Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick uç etiketleme (TUNEL) tekniği kullanıldı. TUNEL boyama için *in situ* hücre ölümü belirleme kiti, POD (Roche, Mannheim, Germany) kullanıldı ve prosedür üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Nekroz alanları bulunmayan, homojen boyanmış kahverengi nükleuslu TUNEL(+) hücreler apoptotik hücre olarak tanımlandı. Apoptotik hücrelerin gösterilmesinde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Geliştirilmiş Sıvı Substrat Sistemi Tetrahidroklörür, karşıt boyama için de Mayer's hematoxileni kullanıldı. Karaciğerde hepatositlerinde, pankreasta Langerhans adacık hücrelerinde apoptoz değerlendirildi. Değerlendirmede 400X büyütmede 5 farklı alanda Analysis 5 Research program (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) ile 100 hücre sayılarak apoptotik ve normal hücreler kaydedildi ve yüzde apoptotik indeks (AI) hesaplandı ( $\%AI = \frac{\text{TUNEL (+) hücre sayısı}}{\text{toplam hücre sayısı}} \times 100$ ) (121).

### 3.12. İstatistiksel Analizler

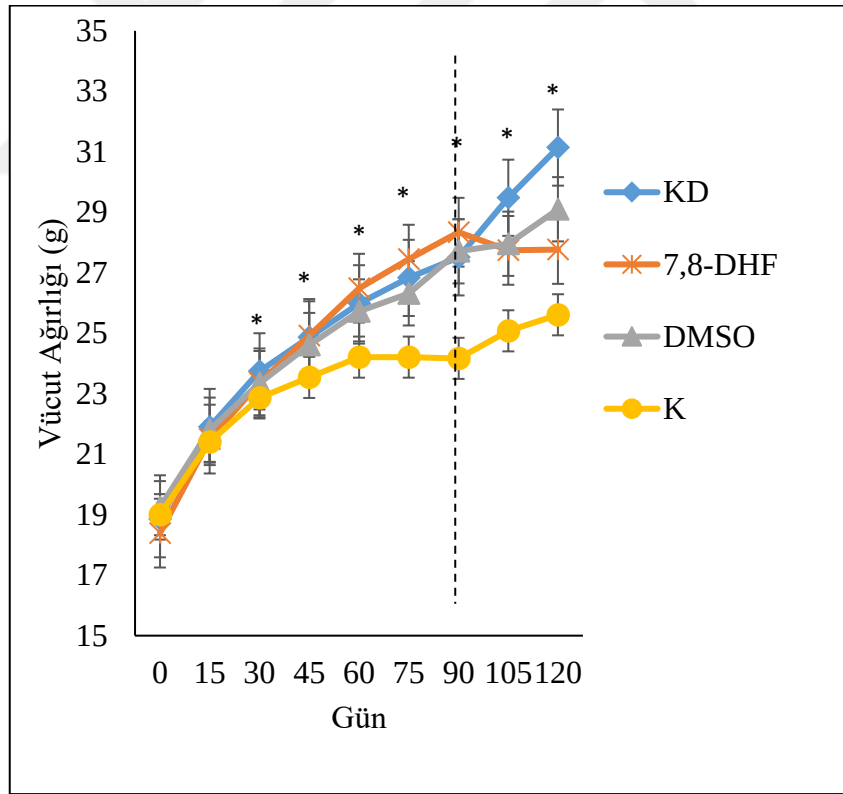
Verilerin istatistiksel analizi için SPSS (IBM SPSS Statistics 23) programı kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel fark Kruskal Wallis varyans analizi ile belirlendi. Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar ise Mann–Whitney U testi ile yapıldı. Sonuçlar medyan ve %25-75'lik çeyreklikler şeklinde ifade edildi. Ağırlık ve OGTT'ye ait grafikler çizilirken, histopatolojik skorlamalar ve RT-PCR verileri ifade edilirken ortalama±standart hata (ortalama±SE) değerleri kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen bulguların tümü “Life Sciences” dergisinde “7,8-Dihydroxyflavone alleviates Endoplasmic Reticulum Stress in cafeteria diet-induced metabolic syndrome” başlığı ile araştırma makalesi olarak yayınlanmıştır (122) (Bkz. Ek 2).

##### 4.1. 7,8-Dihidroksiflavyonun Vücut Ağırlığı, Epididimal Yağ Dokusu ve %Adiposite İndeksi Üzerine Etkisi

Deneyin ilk dört haftasından itibaren KD grubu, kontrol grubuna kıyasla vücut ağırlıklarını anlamlı derecede arttırdı ( $p<0.01$ ) (Şekil 7). Deney sonunda 7,8-DHF grubunun ağırlıkları KD ve DMSO grubuna göre anlamlı derecede azaldı ( $p<0.05$ ) (Tablo 8). EYD ve % Adiposite İndeksi değerleri KD grubunda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttı ( $p<0.01$ ). 7,8-DHF grubunun EYD ve % Adiposite İndeksi değerleri ise KD ve DMSO grubuna göre anlamlı derecede azaldı ( $p<0.05$ ) (Tablo 8).



**Şekil 7.** 16 haftalık diyet süresince gruplardaki ağırlık değişimi (ortalama $\pm$ SE). \*: Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ). - Kesikli çizgi: 7,8-DHF uygulamasına başlanılan gün

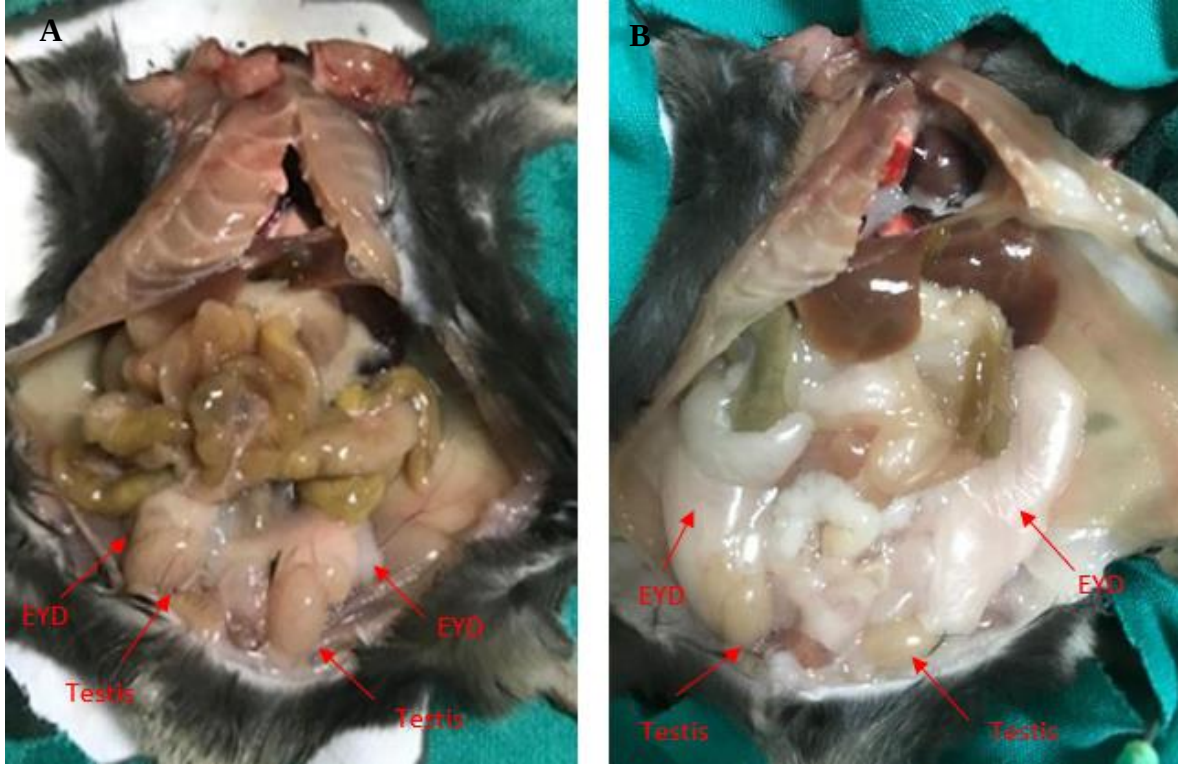
**Tablo 8.** Grupların vücut ağırlıkları ile EYD ve % Adiposite İndeksi değerleri

|             | <b>K</b>    | <b>KD</b>            | <b>7, 8-DHF</b>        | <b>DMSO</b>              |
|-------------|-------------|----------------------|------------------------|--------------------------|
| Başlangıç   | (18.90)     | (18.70)              | (18.30)                | (19.75)                  |
| Ağırlığı(g) | 18.13-19.55 | 18.25-19.50          | 17.53-19.20            | 18.30-20.15              |
| Deney Sonu  | (25.45)     | (31.15) <sup>a</sup> | (28.15) <sup>a,b</sup> | (29.15) <sup>a,b,c</sup> |
| Ağırlık (g) | 24.75-27.42 | 29.80-32.63          | 26.83-28.78            | 28.63-29.78              |
| EYD (g)     | (0.40)      | (1.20) <sup>a</sup>  | (0.75) <sup>a,b</sup>  | (0.95) <sup>a,b,c</sup>  |
|             | 0.30-0.42   | 1.05-1.52            | 0.67-0.90              | 0.77-1.12                |
| %Adiposite  | (1.51)      | (3.76) <sup>a</sup>  | (2.62) <sup>a,b</sup>  | (3.29) <sup>a,c</sup>    |
| İndeksi     | 1.20-1.69   | 3.42-4.18            | 2.02-3.11              | 2.57-3.77                |

Değerler (medyan) %25-75'lik çeyreklikler şeklinde verildi.

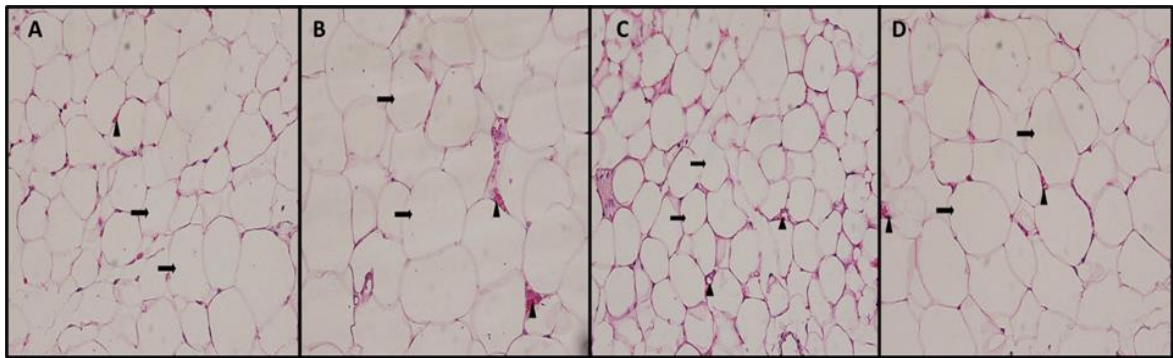
<sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>: KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

Dört aylık besleme periyodu sonrasında 12 saat aç bırakılan fareler dekapitasyon ile sakrifiye edildi ve EYD örnekleri çıkarıldı. Kafeterya ve kemirgen diyetiyle beslenen farelerin EYD'leri arasındaki karşılaştırma Resim 6'da österilmiştir.



**Resim 6.** Besleme periyodu sonrasında kafeterya ve kemirgen diyetiyle beslenen farelerin EYD'leri. A: Kemirgen diyetiyle diyetle beslenen bir fare; B: Kafeterya diyetiyle beslenen fare

Epididimal yağ dokusu histopatolojik analizinde ise KD grubunda adipositler kontrol grubuna göre daha büyük ve yuvarlak şekilli olarak izlendi. Adipositler arasında kılcal damarlar ve vazokonjeksiyon izlendi. 7,8-DHF grubunda ise yağ hücreleri kontrol grubuna benzer morfoloji gösterdi ve yağ hücreleri arasında yer yer vazokonjeksiyon gösteren kılcal damarlar izlendi (Resim 7).



**Resim 7.** Yağ dokusuna ait fotomikrograf (H&E 200X). Yağ hücresi (Ok), Vasküler konjeksiyon (Ok başı). A: K; B: KD; C: 7,8-DHF; D:DMSO



#### **4.2. 7,8-Dihidroksiflavonun Serum Biyokimya Parametreleri, İnsülin, İnterlökin-1 $\beta$ ve Doku Trigliserid Seviyeleri Üzerine Etkisi**

Serum trigliserid, kolesterol ve glukoz genel metabolik durumu; amilaz pankreas fonksiyonunu; ALT ve AST ise karaciğer fonksiyonunu değerlendirmek için incelendi (Tablo 9). Trigliserid, kolesterol, amilaz, ALT ve glukoz değerleri KD grubunda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Trigliserid, kolesterol, amilaz, ALT, AST ve glukoz değerleri ise KD grubuna kıyasla 7,8-DHF grubunda anlamlı düşük bulundu ( $p<0.05$ ). İnsülin direncini belirlemek için insülin ve inflamatuvar durumu değerlendirmek için IL-1 $\beta$  seviyeleri incelendi. HOMA-IR ve IL-1 $\beta$  değerleri tüm gruplarda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ), 7,8-DHF grubunda, KD grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Karaciğer dokusunda lipid birikimini göstermek için yaptığımız doku trigliserid ölçümünde KD grubunda, kontrol grubuna kıyasla lipid içeriğinin önemli ölçüde arttığını ortaya koyduk ( $p<0.001$ ). 7,8-DHF ise KD grubuna kıyasla karaciğer lipid içeriğini anlamlı derecede azaltmıştır ( $p<0.01$ ) (Tablo 9).

**Tablo 9.** Serum biyokimya parametreleri, insülin, HOMA-IR, IL-1 $\beta$  ve doku trigliserid seviyeleri

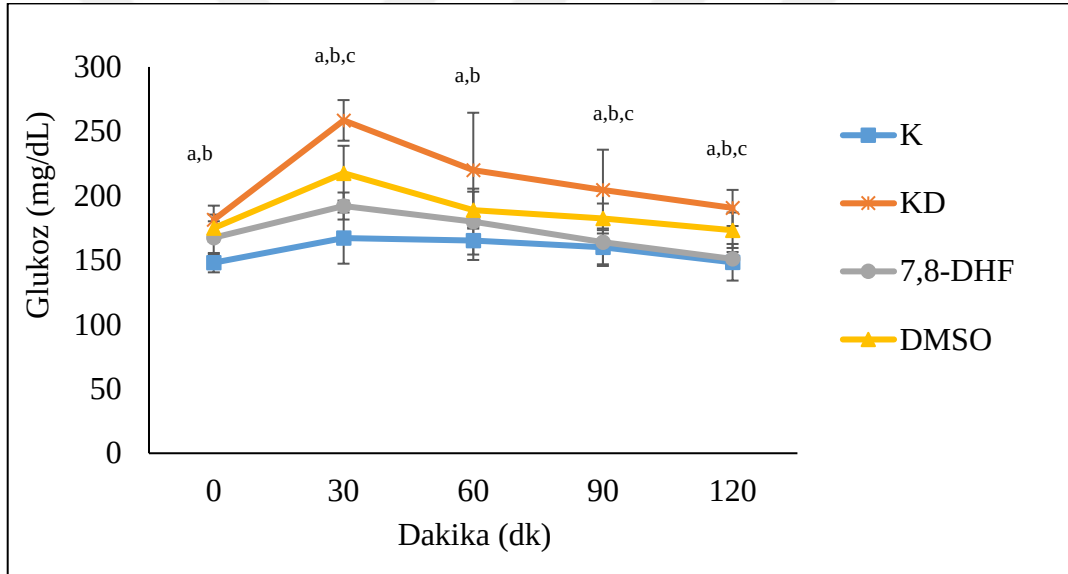
|                                          | K                      | KD                                    | 7,8-DHF                                 | DMSO                                   |
|------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Trigliserid</b><br>(mg/dL)            | (59.50)<br>50.50-65.00 | (72.0) <sup>a</sup><br>69.50-78.50    | (68.0) <sup>b</sup><br>55.50-71.50      | (81) <sup>a,c</sup><br>69.50-93.50     |
| <b>Kolesterol</b><br>(mg/dL)             | (78.0)<br>69.50-79.00  | (167.50) <sup>1</sup><br>159.0-176.50 | (155.50) <sup>a,b</sup><br>149.50-168.0 | (171.0) <sup>a,c</sup><br>163.50-192.0 |
| <b>Amilaz</b><br>(mg/dL)                 | (2021)<br>1650-2163    | (2707) <sup>1</sup><br>2657-2726      | (2395) <sup>a,b</sup><br>2320-2527      | (2720) <sup>a,c</sup><br>2600-2921     |
| <b>ALT(U/L)</b>                          | (179)<br>157-188       | (201) <sup>a</sup><br>184-260         | (176) <sup>b</sup><br>169-183           | (202) <sup>a,c</sup><br>190-208        |
| <b>AST (U/L)</b>                         | (30.0)<br>26.0-31.0    | (28.0)<br>27.0-33.0                   | (26.0) <sup>a,b</sup><br>24.0-28.0      | (28.0) <sup>c</sup><br>26.0-30.0       |
| <b>Glukoz</b><br>(mg/dL)                 | (150)<br>144-175       | (228) <sup>a</sup><br>216-231         | (202) <sup>a,b</sup><br>192-219         | (217) <sup>a,c</sup><br>210-220        |
| <b>İnsülin</b><br>(ng/mL)                | (21.83)<br>16.80-25.77 | (39.69) <sup>a</sup><br>26.23-50.17   | (33.18) <sup>a</sup><br>22.99-36.12     | (33.83) <sup>a</sup><br>31.81-47.48    |
| <b>HOMA-IR</b>                           | (180)<br>142-223       | (527) <sup>a</sup><br>322-638.        | (309) <sup>a,b</sup><br>242-447         | (413) <sup>a</sup><br>372-813          |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b><br>(pg/mL) | (638)<br>620-642       | (971) <sup>a</sup><br>939-1038        | (867) <sup>a,b</sup><br>831-913         | (944) <sup>a</sup><br>806-1043         |
| <b>Trigliserid</b><br>(mg/g)             | (309)<br>240-346       | (497) <sup>a</sup><br>425-542         | (363) <sup>b</sup><br>308-408           | (565) <sup>a,c</sup><br>511-646        |

Değerler (medyan) %25-75'lik çeyreklikler şeklinde verildi.

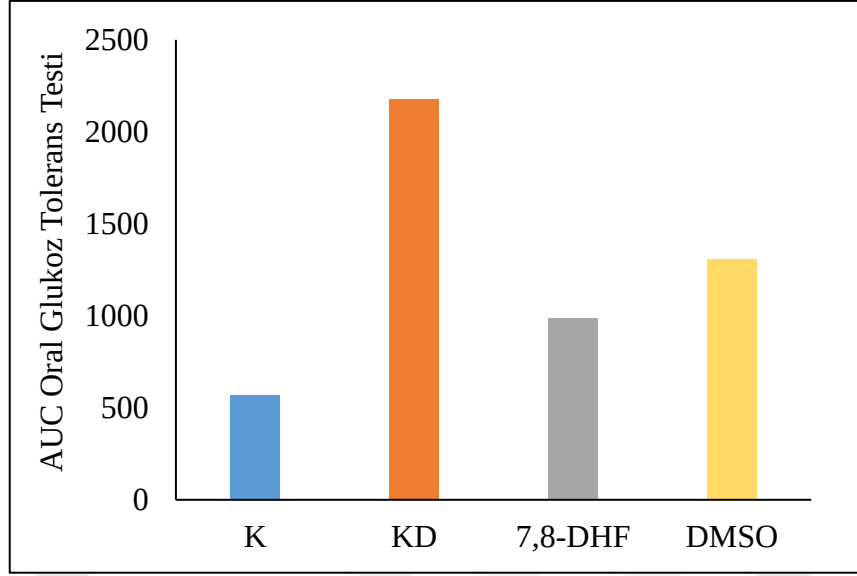
<sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>: KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

#### 4.3. 7,8-Dihidroksiflavonun Oral Glukoz Toleransı Üzerine Etkisi

Beslenme periyodu tamamlanan hayvanlara OGTT işlemi uygulandı. Gruplara göre belirlenen dakikalardaki kan glukozlarındaki değişim Şekil 8 ve Tablo 10'da ve eğrinin altında kalan alan (AUC) ise Şekil 9'da verilmiştir. Bütün ölçümlerde kontrol grubuna kıyasla KD grubunda glukoz değerleri anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Glukoz değerleri başlangıç ve 30. dakika ölçümlerinde kontrol grubuna göre 7,8-DHF grubunda anlamlı yüksek bulunurken, 60., 90. ve 120. dakikalarda bu fark ortadan kalkmış fareler normal glukoz toleransı göstermiştir. Ayrıca 7,8-DHF grubunda kan glukoz değerleri bütün ölçümlerde KD grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Oral glukoz toleransının bozulduğu farelerde 7,8-DHF etkili bir düzeltme göstermiştir.



**Şekil 8.** Gruplara göre belirlenen dakikalarda kan glukozlarındaki değişim (ortalama $\pm$ SE).  
<sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>: KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ).



**Şekil 9.** Gruplara göre belirlenen dakikalarda kan glukozlarındaki değişim için eğrinin altında kalan alan

**Tablo 10.** Gruplara göre belirtilen dakikalardaki kan glukoz değerleri

|               | <b>K</b>         | <b>KD</b>                     | <b>7,8-DHF</b>                  | <b>DMSO</b>                      |
|---------------|------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <b>0.dk</b>   | (148)<br>144-158 | (183) <sup>a</sup><br>176-192 | (153) <sup>a,b</sup><br>154-174 | ( 171) <sup>a</sup><br>166-182   |
| <b>30.dk</b>  | (165)<br>156-214 | (253) <sup>a</sup><br>214-340 | (193) <sup>b</sup><br>181-203   | (215) <sup>b,c</sup><br>201-238  |
| <b>60.dk</b>  | (170)<br>161-179 | (221) <sup>a</sup><br>194-241 | (175) <sup>b</sup><br>168-189   | (189)<br>173-197                 |
| <b>90.dk</b>  | (154)<br>155-171 | (202) <sup>a</sup><br>183-237 | (163) <sup>b</sup><br>148-176   | ( 184) <sup>b,c</sup><br>174-193 |
| <b>120.dk</b> | (152)<br>148-164 | (190) <sup>a</sup><br>185-198 | (151) <sup>b</sup><br>148-156   | ( 178) <sup>b,c</sup><br>164-182 |

Değerler (medyan) %25-75'lik çeyreklikler şeklinde verildi.

<sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>: KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

#### 4.4. 7,8-Dihidroksiflavonun Doku GRP78 ve CHOP Protein Seviyelerine Etkisi

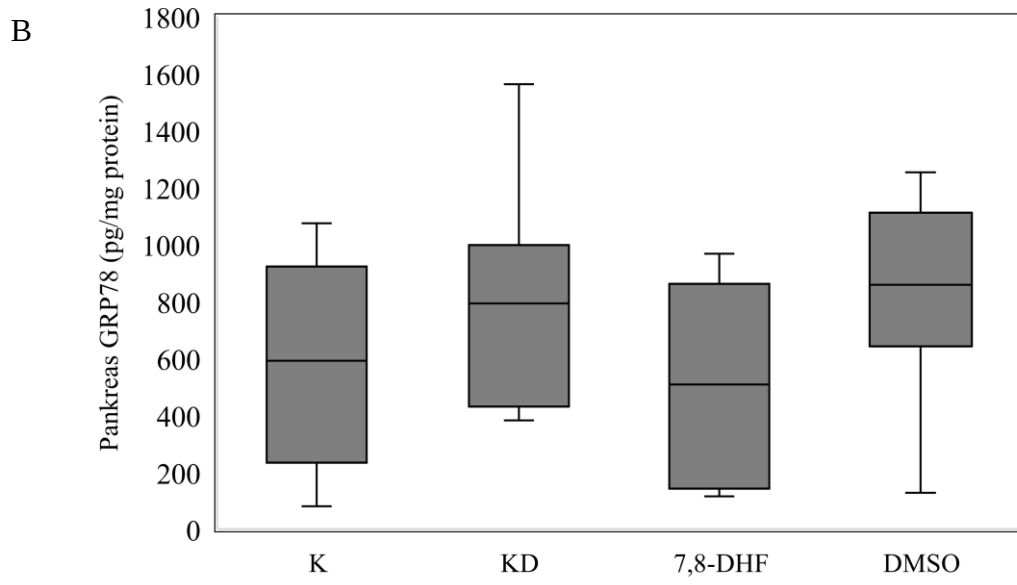
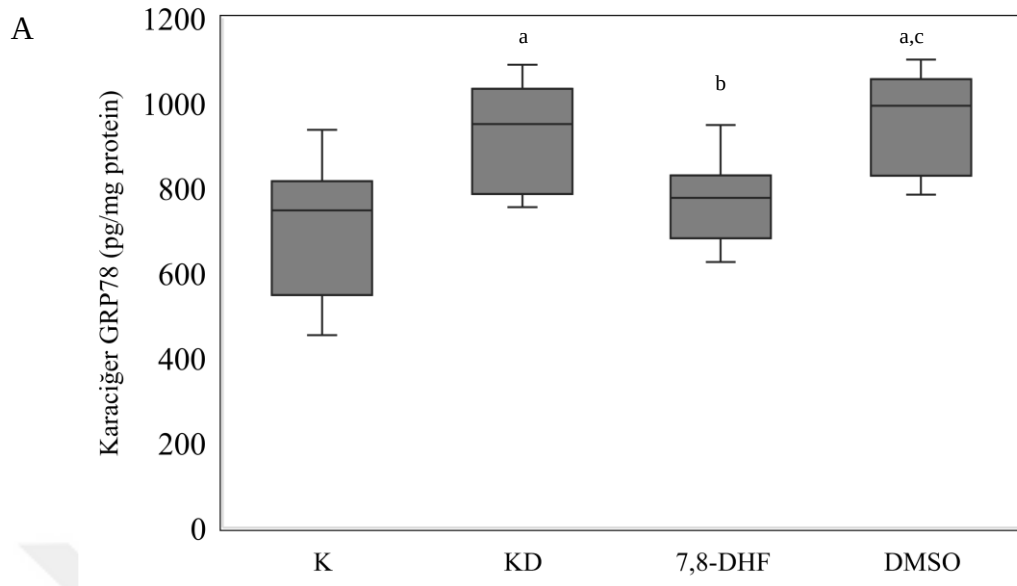
Çalışma gruplarına ait GRP78 ve CHOP konsantrasyonları ve karşılaştırılması Tablo 11, dokulara ait GRP78 konsantrasyonları Şekil 10 ve CHOP konsantrasyonları Şekil 11'de verilmiştir. Karaciğer dokusunda, KD grubunda ER stres biyobelirteçleri olan GRP78 ve CHOP protein seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken ( $p<0.01$ ), pankreas dokusundaki artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p>0.05$ ). Karaciğer dokusunda GRP78 ve CHOP protein seviyeleri 7,8-DHF grubunda, KD grubuna kıyasla anlamlı düşük bulunurken ( $p<0.05$ ), pankreas dokusunda bir fark bulunamamıştır.

**Tablo 11.** Karaciğer ve pankreas dokularına ait GRP78 ve CHOP konsantrasyonları

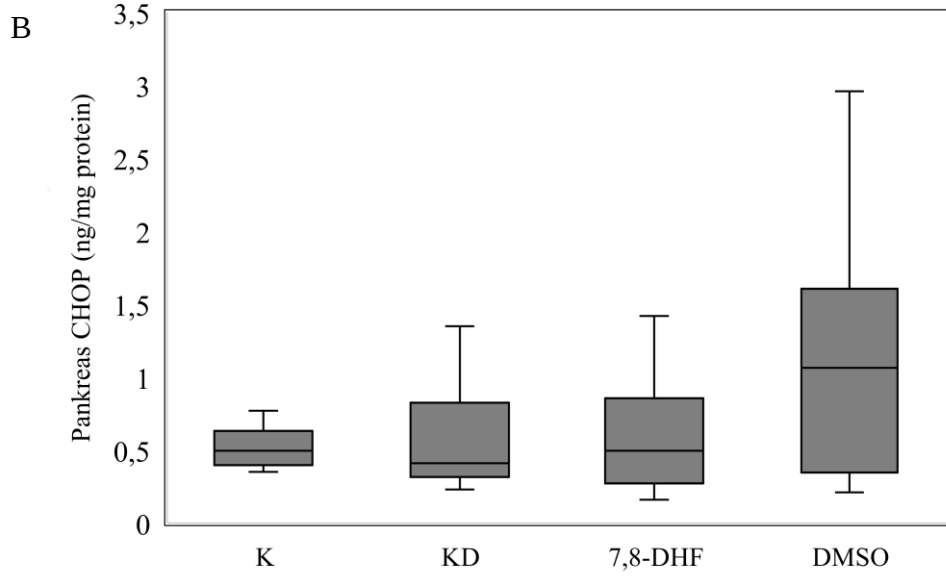
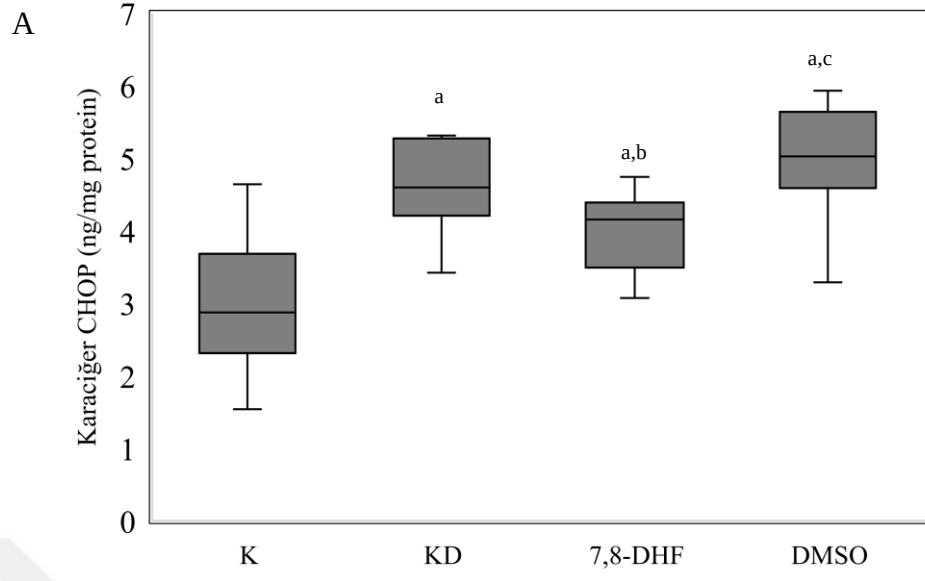
|                   | <b>K</b>            | <b>KD</b>                        | <b>7.8-DHF</b>                     | <b>DMSO</b>                        |
|-------------------|---------------------|----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>KC-GRP78</b>   | (747)<br>547-816    | (950) <sup>a</sup><br>758-1033   | (776) <sup>b</sup><br>681-829      | (993) <sup>a,c</sup><br>828-1055   |
| <b>KC-CHOP</b>    | (2.87)<br>2.31-3.68 | (4.59) <sup>a</sup><br>4.20-5.27 | (4.15) <sup>a,b</sup><br>3.49-4.39 | (5.02) <sup>a,c</sup><br>4.58-5.63 |
| <b>Pank-GRP78</b> | (590)<br>233-922    | (792)<br>430-997                 | (507)<br>142-861                   | (858)<br>642-1110                  |
| <b>Pank-CHOP</b>  | (0.49)<br>0.39-0.63 | (0.41)<br>0.31-0.82              | (0.49)<br>0.27-0.85                | (1.06)<br>0.34-1.60                |

Değerler (medyan) %25-75'lik çeyreklikler şeklinde verildi.

<sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>: KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).



**Şekil 10.** Karaciğer (A) ve pankreas (B) dokularına ait GRP78 seviyeleri. <sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>: KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ).



**Şekil 11.** Karaciğer (A) ve pankreas (B) dokularına ait CHOP seviyeleri. <sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>: KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ).



#### 4.5. 7,8-Dihidroksiflavonun GRP78 ve CHOP Gen Ekspresyon Seviyelerine Etkisi

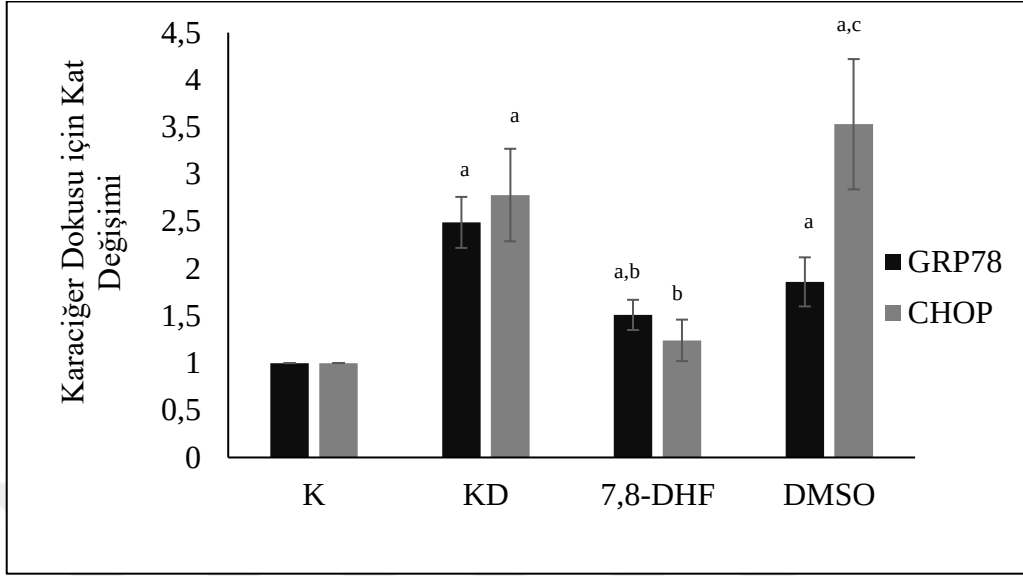
GRP78 ve CHOP gen ekspresyonuna ait sonuçlar Tablo 12, karaciğer ve pankreas dokularında GRP78 ve CHOP gen ekspresyonuna ait sonuçlar sırasıyla Şekil 12 ve 13'te verilmiştir. Karaciğer dokusunda GRP78 ve CHOP gen ekspresyonları KD grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunurken; pankreas dokusunda sadece GRP78 seviyeleri anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). 7,8-DHF ile muamele edilen gruplarda karaciğer dokusunda KD grubuna göre GRP78 ve CHOP seviyeleri, pankreas dokusunda ise GRP78 seviyeleri anlamlı ölçüde azalmıştır ( $p<0.05$ ).

**Tablo 12.** Karaciğer ve pankreas dokularına ait GRP78 ve CHOP ekspresyon sonuçları

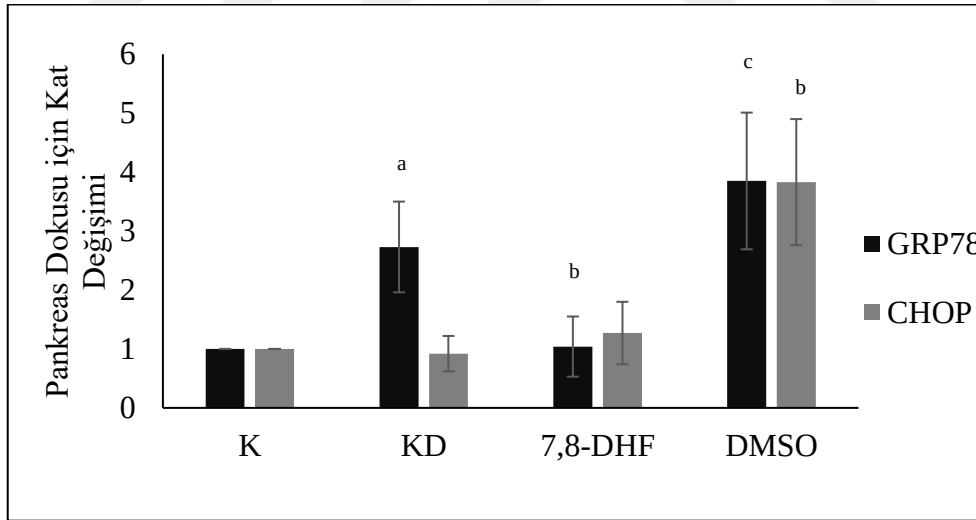
|                   | K   | KD                     | 7.8-DHF                  | DMSO                     |
|-------------------|-----|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>KC-GRP78</b>   | 1.0 | 2.49±0.27 <sup>a</sup> | 1.51±0.16 <sup>a,b</sup> | 1.86±0.26 <sup>a</sup>   |
| <b>KC-CHOP</b>    | 1.0 | 2.78±0.49 <sup>a</sup> | 1.24±0.22 <sup>b</sup>   | 3.53±0.69 <sup>a,c</sup> |
| <b>Pank-GRP78</b> | 1.0 | 2.73±0.77 <sup>a</sup> | 1.04±0.51 <sup>b</sup>   | 3.85±1.16 <sup>c</sup>   |
| <b>Pank-CHOP</b>  | 1.0 | 0.92±0.30              | 1.27±0.53                | 3.83±1.07 <sup>b</sup>   |

Değerler ortalama±SE şeklinde verildi.

<sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>:KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ).



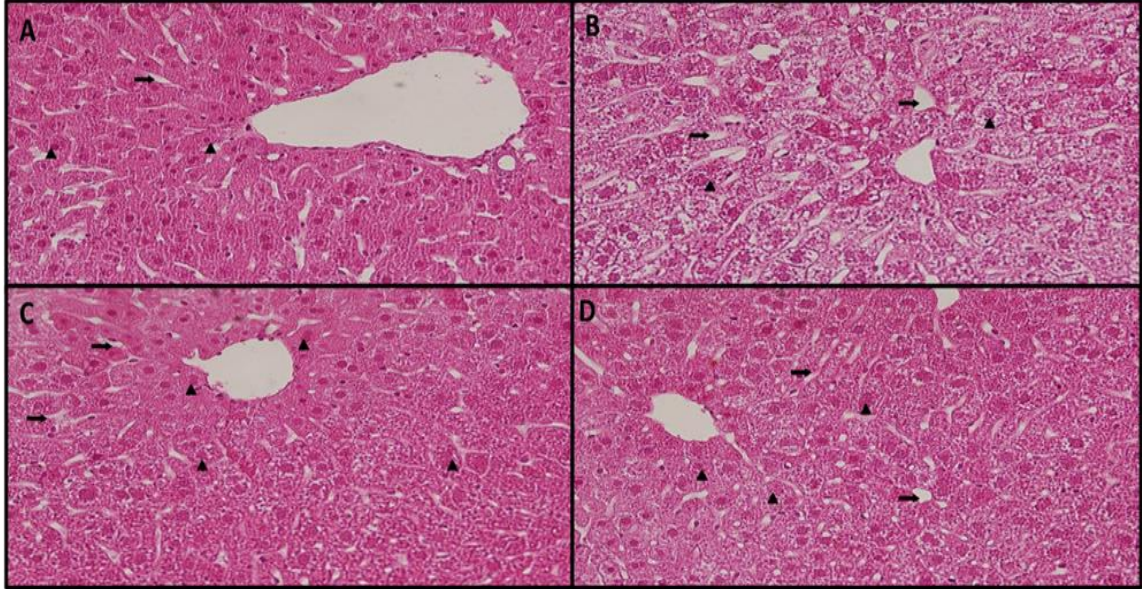
**Şekil 12.** Karaciğer dokusunda GRP78 ve CHOP gen ekspresyonuna ait sonuçlar. Değerler ortalama $\pm$ SE şeklinde verildi. <sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>:KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ).



**Şekil 13.** Pankreas dokusunda GRP78 ve CHOP gen ekspresyonuna ait sonuçlar. Değerler ortalama $\pm$ SE şeklinde verildi. <sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>:KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ).

#### 4.6. 7,8-DHF'nin Histolojik Parametreler Üzerine Etkisi

Karaciğer dokularının ışık mikroskopik değerlendirmesinde ise veriler Resim 8 ve skorlamalar Tablo 13'te verilmiştir. Kontrol grubunda normal karaciğer dokusu morfolojisi izlendi. Hepatositler ve sinüzoidal aralık normal görünümde izlendi (Resim 8A). KD grubunda vena centralis etrafında yaygın olarak hepatositlerde dejenerasyon ve sinüzoidal aralıkta genişleme izlendi (Resim 8B). 7,8-DHF grubunda vena centralis etrafında normal yapıda hepatositler mevcuttur. Vena centralisten uzak alanlarda hepatositlerde dejenerasyon ve sinüzoidal aralıklar normal morfolojide izlendi (Resim 8C). DMSO grubunda ise vena centralis etrafında yaygın olarak hepatositlerde dejenerasyon ve sinüzoidal aralıkta genişleme izlendi (Resim 8D).



**Resim 8.** Karaciğer dokusuna ait fotomikrograf. Hepatosit (Ok başı), sinüzoidal dilatasyon (Ok) (H&E X 200). **A:**K; **B:** KD; **C:**7,8-DHF, **D:**DMSO

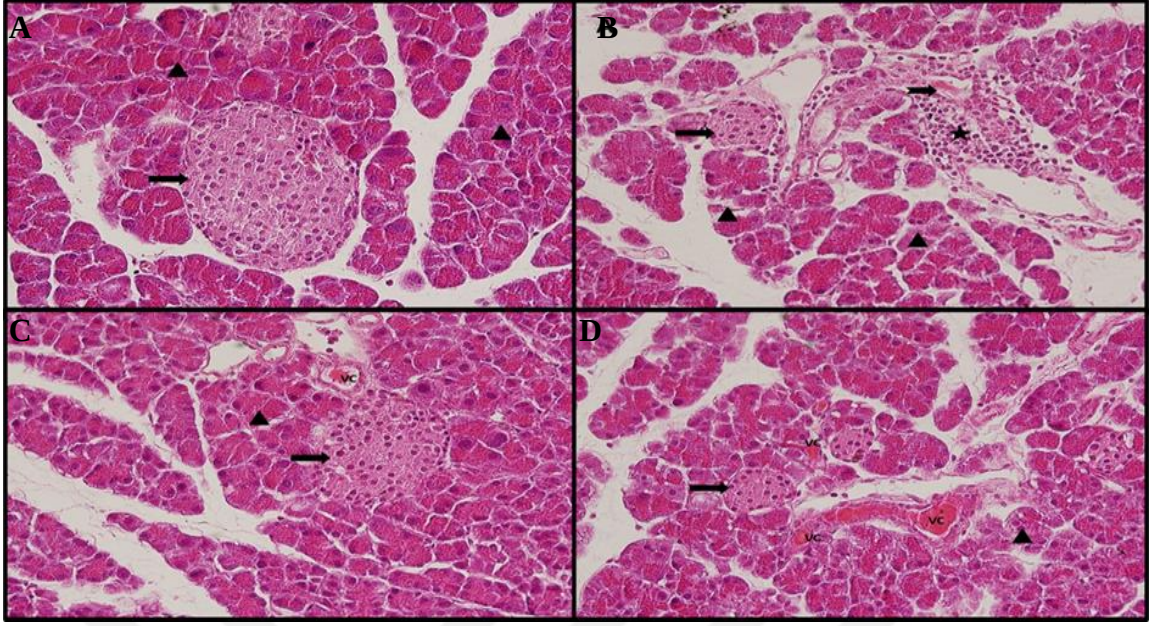
**Tablo 13.** Karaciğer dokusuna ait morfolojik değişim skorları

| Karaciğer                        | K         | KD                     | 7,8-DHF                  | DMSO                     |
|----------------------------------|-----------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Vasküler Konjesyon               | 0.30±0.15 | 2.60±0.16 <sup>a</sup> | 1.40±0.16 <sup>a,b</sup> | 2.30±0.21 <sup>a,c</sup> |
| Hemoraji                         | 1.00±0.14 | 1.30±0.15              | 1.50±0.16                | 1.50±0.16 <sup>a</sup>   |
| İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu | 1.50±0.22 | 2.10±0.17 <sup>a</sup> | 1.60±0.16                | 1.80±0.13                |
| Ödem                             | 0.80±0.13 | 1.40±0.16 <sup>a</sup> | 1.10±0.10                | 1.20±0.13                |

Değerler ortalama±SE şeklinde verildi.

<sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>:KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

Gruplara ait pankreas dokularının ışık mikroskopik değerlendirmesinden elde edilen veriler Resim 9 ve skorlamalar Tablo 14’te verilmiştir. Kontrol grubunda normal pankreas seröz asinus ve adacık yapısı izlendi (Resim 9A). KD grubunda pankreas langerhans adacık hücreleri normal yapıda izlendi. Pankreas seröz asinus hücrelerinde yaygın dejenerasyon. interlobüler alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, intraduktal ödem ve intralobüler damarlarda vasküler konjesyon izlendi (Resim 9B). 7.8-DHF grubunda pankreas langerhans adacık hücreleri ve pankreas seröz asinus hücreleri normal yapıda izlendi. İntralobüler damarlarda hafif düzeyde intravasküler konjesyon ve yer yer hafif derecede intraduktal ödem izlendi (Resim 9C). DMSO grubunda pankreas langerhans adacık hücreleri normal yapıda izlendi. Pankreas seröz asinus hücrelerinde orta derecede dejenerasyon, intraduktal ödem ve intralobüler damarlarda vasküler konjesyon izlendi (Resim 9D).



**Resim 9.** Pankreas dokusuna ait fotomikrograf. Seröz asinus (Ok başı), Langerhans adacığı (Ok), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız), intraduktal ödem (çentikli ok), vasküler konjesyon (VC) (H&E X 200). **A:** K; **B:** KD; **C:**7.8-DHF; **D:**DMSO

**Tablo 14.** Pankreas dokusuna ait morfolojik değişim skorları

|                                         | K         | KD                     | 7,8-DHF                  | DMSO                     |
|-----------------------------------------|-----------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Vasküler Konjesyon</b>               | 0.30±0.15 | 1.90±0.23 <sup>a</sup> | 1.20±0.16 <sup>a,b</sup> | 1.50±0.16 <sup>a</sup>   |
| <b>Hemoraji</b>                         | 0.10±0.10 | 0.30±0.15              | 0.30±0.15                | 0.50±0.16                |
| <b>İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu</b> | 0.20±0.13 | 2.00±0.14 <sup>a</sup> | 0.60±0.16 <sup>b</sup>   | 1.00±0.21 <sup>a,b</sup> |
| <b>Ödem</b>                             | 0.10±0.10 | 2.30±0.15 <sup>a</sup> | 0.50±0.16 <sup>b</sup>   | 0.80±0.13 <sup>a,b</sup> |

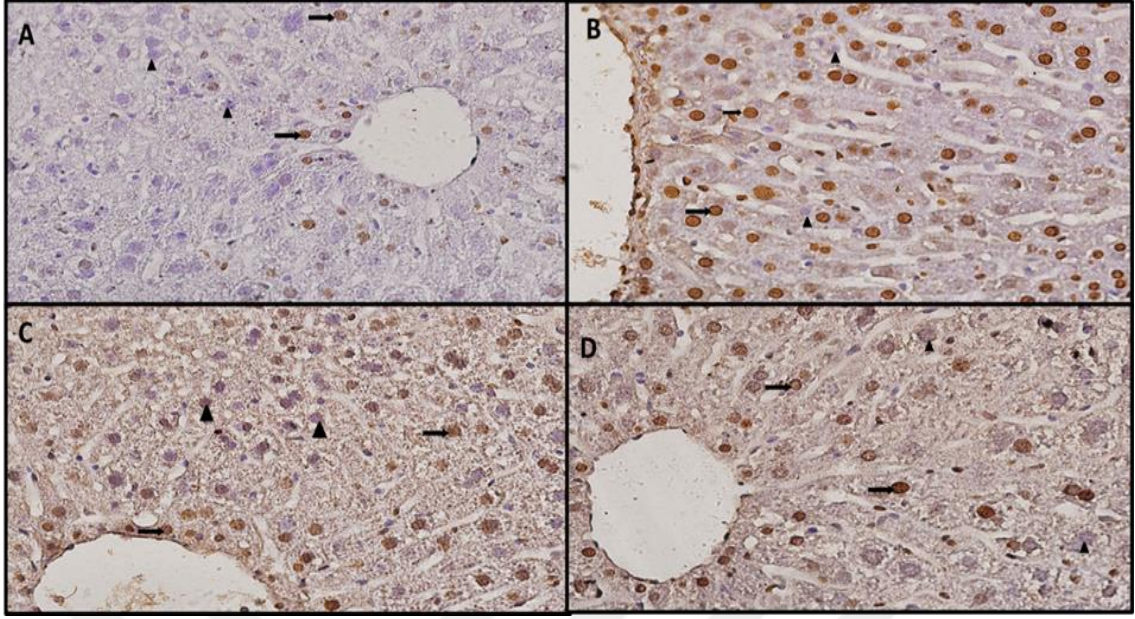
Değerler ortalama±SE şeklinde verildi.

<sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>:KD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).

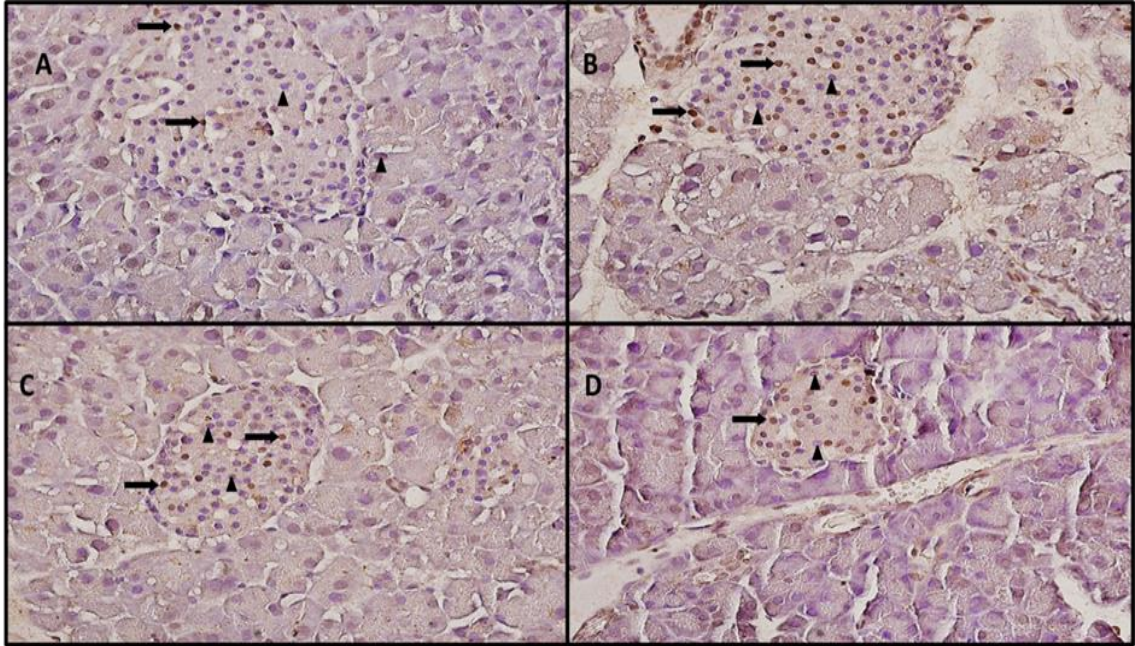
#### 4.7. 7,8-DHF'nin Apotoz Üzerine Etkisi

Karaciğer hepatositlerinin apoptoz değerlendirmesi Resim 10 ve Tablo 15'te, pankreas langerhans adacık hücrelerinin apoptoz değerlendirmesi ise Resim 11 ve Tablo 15'te verilmiştir. Karaciğer ve pankreas dokularına ait %AI değerlerinde, tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış bulunmuştur (p<0.001). 7,8-DHF grubunda ise hem KD hem de DMSO grubuna göre anlamlı bir azalma bulunmuştur (p<0.01). 7,8-DHF'nin apoptotik hücre sayısını anlamlı ölçüde azalttığı söylenebilir.





**Resim 10.** Karaciğer dokusuna ait apoptoz görüntüleri. TUNEL (-) hücre (Ok başı). TUNEL (+) hücre (Ok) (TUNEL X 400). **A:** K; **B:** KD; **C:** 7.8-DHF; **D:** DMSO



**Resim 11.** Pankreas dokusuna ait apoptoz görüntüleri. TUNEL (-) hücre (Ok başı). TUNEL (+) hücre (Ok) (TUNEL X 400). **A:** K; **B:** KD; **C:** 7.8-DHF; **D:** DMSO

**Tablo 15.** Pankreas ve karaciğer dokusuna ait %AI değerleri

| %AI              | K                   | KD                                 | 7,8-DHF                             | DMSO                                   |
|------------------|---------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| <b>Pankreas</b>  | (9.0)<br>7.75-11.25 | (37.0) <sup>a</sup><br>31.25-40.25 | (17.0) <sup>a,b</sup><br>12.5-18.25 | (29.0) <sup>a,b,c</sup><br>25.25-31.25 |
| <b>Karaciğer</b> | (9.0)<br>8.75-11.25 | (81.0) <sup>a</sup><br>73.50-83.50 | (51.50) <sup>a,b</sup><br>49-57.50  | (64.50) <sup>a,b,c</sup><br>60.50-69.0 |

Değerler (medyan) %25-75'lik çeyreklikler şeklinde verildi.

<sup>a</sup>:Kontrol; <sup>b</sup>: KD; <sup>c</sup>:7,8-DHF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05).



#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Obezite, T2D, KVH ve AYKH gibi metabolik bozukluklar insan sağlığına yönelik en ciddi tehditler arasında hızlı bir şekilde yerini almaktadır. Bu hastalıkların her birinin farklı fizyolojik ve klinik semptomları vardır. Ancak modern ve sedanter toplumlarda sıklıkla rastlanan aşırı ve sağlıksız beslenme davranışları (kafeterya diyeti tüketimi gibi) sebebiyle meydana gelen bu metabolik bozukluklarda, hücre içi stres ve inflamasyon gibi belirli patolojik özelliklerin ortak olduğu görülmektedir. Modern yaşam tarzı, hücrelerde ve organlarda aşırı miktarda karbohidrat ve yağ birikimine sebep olarak, oluşan metabolik hasarla başa çıkmak için oksidatif stres ve ER stresini gibi çeşitli hücre içi stres sinyallerini indükleyen glukotoksisiteye ve lipotoksisiteye yol açmaktadır (66). Metabolik bozuklukların hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerinde, ER stresini baskılayan doğal ve sentetik birkaç molekül belirlenmiştir. Kuersetin, elatosid ve berberin gibi birkaç bileşik ER stresini çeşitli mekanizmalarla azaltma eğilimi göstermişlerdir (90, 91, 93). Ayrıca, nörotrofik bir faktör olan BDNF'nin de ER stresine karşı koruyucu bir etkisinin olduğu bildirilmiştir. BDNF'nin nöronal ve endometriyal epitel hücrelerinde ER stresini sırasında CHOP/GADD153 yolunu ve/veya kaspaz-12 aktivasyonunu inhibe ederek apoptozu azalttığı, bu sayede ER stresini baskıladığı gösterilmiştir (123-125). Bu bilgilerden yola çıkarak yapılan bu tez çalışmasında, bir BDNF mimesi ve TrkB agonisti olan, antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptik etkilere sahip olduğu bilinen 7,8-DHF'nin kafeterya diyetiyle indüklenmiş fare metabolik sendrom modelinde, karaciğer ve pankreas dokularındaki ER stresine etkisini incelemeyi amaçladık.

Metabolik hastalıkları incelemek için çeşitli deney modelleri geliştirilmiştir. Ob/ob fareleri, db/db fareleri, Agouti sarı fareleri, melanokortin dört reseptörü nakavt fareler ve Zucker fa/fa obez sıçanları gibi genetik obezite modelleri, enerji homeostazını kontrol eden mekanizmaların altında yatan genetik anormalliklerin anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Ancak, insanlarda görülen metabolik bozuklukların altında yatan mekanizmaların çoğunda sağlıksız beslenme davranışları yer aldığından, DIO modelleri insanlarda gözlenen metabolik hastalıklar hakkında daha fazla bilgi vermektedir (126). Geleneksel olarak bu modellerde, düşük yağlı diyet veya kontrol diyetiyle karşılaştırıldığında, yüksek karbohidrat ve yağ içeren diyetler kullanılmaktadır. Özellikle batı toplumlarında yaygın olan ve mevcut obezite salgınıyla ilişkilendirilen oldukça lezzetli, enerjisi yoğun gıdaların çeşitliliğini daha doğru bir şekilde yansıtan kafeterya diyeti başka

bir deneysel kemirgen diyet modeli olarak kullanılmaktadır (127). Bu tür bir diyet yüksek lezzetliliğe ve daha da önemlisi yiyecek seçeneklerinin çeşitliliğine dayalı olarak kemirgenlerde daha yüksek motivasyonel uyaranlar sağlamaktadır. Bu sebeple yüksek yağlı bir diyetle karşılaştırıldığında KD, daha yüksek kalori tüketimi, glukoz intoleransı ve inflamasyon ile obezitenin davranışsal ve metabolik fenotipini daha iyi yansıtmaktadır (128). Yukarıda bahsedilen sebeplerden dolayı kafeterya diyeti, insanlarda gelişen MetS'in patofizyolojisini anlamak için kullanılabilecek kuvvetli bir diyet modeli olarak ifade edilmiştir (129). Metabolik hastalıkların araştırılacağı deney hayvanı çalışmalarında C57BL/6 ırkı fareler sıklıkla kullanılmaktadır. İnsanlardaki gibi MetS'i tanımlayacak kesin tanı kriterleri olmamakla beraber, bu farelerde MetS oluşumu obezite, hiperglisemi ve dislipidemi oluşmasına bakılarak değerlendirilmektedir (21). Buyukdere ve ark. (45) tarafından yapılan bir çalışmada, KD'nin yüksek yağlı diyetle kıyasla, sıçanlarda obeziteyi, hiperfajiyi ve enerji alımını daha iyi tetiklediği ve KD ile beslenen hayvanların daha fazla kilo aldığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada da KD'nin, geleneksel domuz yağı bazlı yüksek yağlı diyetle kıyasla glukoz intoleransı ve inflamasyon gibi obezite belirteçleri ile daha sağlam bir insan MetS modeli sunduğu, bu modelin günümüz batı medeniyetinde yaygın olan obezite ve obezite ile ilişkili hastalık durumlarının biyokimyasal, genomik ve fizyolojik mekanizmalarını incelemek için benzersiz bir platform sağladığı ileri sürülmüştür (5). Yapılan bu tez çalışmasında hazırlanmış olduğumuz KD'nin, farelerin total vücut ağırlıklarını, EYD ağırlığını, % adiposite indeksini, serum trigliserid, kolesterol, glukoz ve HOMA-IR değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde arttırdığı ve bozulmuş OGTT'ye neden olduğu görüldü ( $p<0.05$ ) (Şekil 8 ve Tablo 8, 9, 10). Epididimal yağ dokusunun histolojik değerlendirilmesinde de, KD grubundaki farelerin artan ağırlıkla paralel olarak epididimal yağ birikiminde de bir artış olduğu ve bunun da adiposit hipertrofisine yol açtığı ortaya konuldu (Resim 6). Bu veriler farelerde metabolik sendrom geliştiğinin göstergesi olarak kabul edildi. Kafeterya diyeti neticesinde MetS geliştiği ortaya konulduktan sonra, enerji metabolizmasında önemli rolleri olan karaciğer ve pankreas dokularında ER stresinin gelip gelişmediği incelendi. Bu dokularda ER stresini incelemek için, bir ER stres sensörü olan GRP78'in ve bir apoptoz belirteci olan CHOP'un mRNA ekspresyon ve protein seviyeleri araştırıldı. Aynı zamanda bu dokular H&E boyaması ve TUNEL kiti kullanılarak histopatolojik açıdan değerlendirildi. Karaciğer dokusunda ER stresini belirlemek için yaptığımız ölçümlerde KD grubunda kontrol grubuna kıyasla, GRP78'in ve CHOP'un hem protein hem de gen seviyesinde anlamlı yüksek olduğu görüldü ( $p<0.05$ ) (Şekil 10, 12 ve

Tablo 11, 12). Ayrıca histopatolojik değerlendirmeler neticesinde, kontrol grubuna göre KD'de anlamlı ölçüde artan vasküler konjesyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve ödem gibi morfolojik değişim skorları ve %AI değerleri elde edildi ( $p<0.05$ ) (Resim 8, 10 ve Tablo 13, 15). Pankreas dokusunda yapılan ölçümlerde ise KD grubunda kontrol grubuna kıyasla, GRP78 mRNA ekspresyon seviyelerinin anlamlı seviyede arttığı bulundu ( $p<0.05$ ) (Şekil 13, Tablo 12). CHOP gen ve protein düzeylerinde anlamlı bir değişiklik bulunamasa da, TUNEL kit boyaması sonucunda KD grubunda kontrol grubuna göre elde edilen yüksek %AI değerleri ( $p<0.05$ ) (Resim 11, Tablo 15) bu dokuda aktive olan ER stresi sonrasında apoptoz geliştiğinin göstergesi olarak kabul edildi. Aynı zamanda pankreas dokusunda da karaciğer dokusundakine benzer morfolojik değişim skorları da elde edilmiştir ( $p<0.05$ ) (Resim 9, Tablo 14). Tüm bu veriler karaciğer ve pankreas dokularında kafeterya diyetiyle indüklenen MetS'de ER stresinin geliştiğini desteklemektedir.

BDNF/TrkB sinyalinin manipüle edilmesi, obezite gelişimiyle mücadelede veya önlenmesinde potansiyel bir stratejiyi temsil etmektedir. 7,8-DHF ise TrkB aktivasyonuna neden olabilen daha küçük ve yarılanma ömrü daha yüksek tipik bir BDNF mimetiği olarak keşfedilmiştir (7). Wood ve ark. (12) yaptıkları çalışmada 7,8-DHF uygulamasının, kas mitokondriyal solunumu ve sistemik enerji tüketimini artırarak vücut ağırlığı artışını hafiflettiğini ve obezitenin neden olduğu metabolik anormallikleri kısmen tersine çevirdiğini ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlarla uyumlu olarak çalışmamızda kafeterya diyeti tüketen farelere dört hafta boyunca 7,8-DHF uygulanması, dislipidemi, hiperglisemi ve obezite gibi MetS parametrelerinde ve ER stres belirteçlerinde anlamlı bir azalmaya yol açmıştır ( $p<0.05$ ) (Şekil 10, 11, 12, 13) (Tablo 8, 9, 11 ve 12). MetS parametrelerindeki bu azalmada 7,8-DHF'nin, yukarıdaki çalışmada bahsedildiği gibi sistemik enerji tüketimini arttırmasının yanı sıra, ER stresini azaltmasındaki etkisinden dolayı da olabileceği değerlendirilmiştir.

ER stresi ve obezite bir kısır döngü oluşturmaktadır. ER stresi obeziteye katkıda bulunurken, obezite de ER stresini şiddetlendirmektedir. Başlangıçta UPR, ER stresine adaptif bir yanıt olsa da UPR'nin hiperaktivasyonu obezitede olumsuz bir süreç haline gelmektedir. Bu nedenle, ER stresini azaltabilen yeni terapötiklerin ve yeme-içme alışkanlıklarındaki değişikliklerin, hem ER stresi hem de obezite ile mücadelede etkili olabileceği ileri sürülmüştür (2). Bu bağlamda 7,8-DHF adipoziteyi azaltma ve metabolik bozuklukları iyileştirme yoluyla ER stresi ve obezite arasındaki bu kısır döngüyü kırmada etkili bir terapötik bileşik olabilir. Yapılan in vivo çalışmalarda uzun süreli 7,8-DHF

tedavisinin farelerde herhangi bir toksisiteye neden olmadığı gösterilmiştir. 5 mg/kg/gün olacak şekilde 3 hafta boyunca 7,8-DHF ile tedavi edilen C57BL/6 ırkı farelerde patolojik değişiklikler karşılaştırılmıştır. İlaçla tedavi edilen gruba ait böbrek, karaciğer, akciğer, kas, dalak, korteks, hipokampus, kalp, bağırsak ve testislerde hiçbir olumsuz patolojik değişiklik tespit edilmemiştir (130). Ek olarak, tam kan sayımı analizi, ilaçla tedavi edilen fareler ile salinle tedavi edilen kontrol fareleri arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir (11). Başka bir uzun süreli besleme deneyinde, 20 hafta boyunca yaklaşık 2.4 µg 7,8-DHF/gün alan dişi farelerde normal tam kan sayımı değerleri gösterilmiştir (11). Bu veriler, kronik tedavi sırasında 7,8-DHF'nin fareler için toksik olmadığını destekler niteliktedir. Yapılan çalışmalarda daha farklı konsantrasyonlarda (10-50 mg/kg) 7,8-DHF uygulaması yapılmış olmasına rağmen, bu çalışmalar genellikle tek doz veya kısa süreli uygulama yapılan çalışmalardır (131, 132). Literatürün geneliyle uyumlu olacak şekilde, çalışmamızda dört hafta boyunca 5 mg/kg/gün 7,8-DHF intraperitoneal uygulamasını tercih ettik.

Metabolik olarak sağlıklı obez ve/veya prediyabet veya erken evre T2D'si olan bireylerin ayırt edici özelliklerinden biri kronik açlık hiperinsülinemisi. Hiperinsülinemi ve neden olduğu ER stresi, AYKH gelişimine hepatosit lipid homeostazı üzerindeki etkiler yoluyla doğrudan ve adiposit genişlemesi yoluyla dolaylı olarak katkıda bulunabilmektedir. Hepatik steatozda ve ardından T2D'de hiperinsülineminin nedensel rolü giderek daha fazla kabul edilmektedir (133). Hiperinsülinemi ve buna bağlı olarak gelişen insülin direnci birçok organda fonksiyon bozukluğuna neden olmakta ve ER stresi de tüm bu düzensizliklerin gelişiminde yer almaktadır. Diyetle alınan aşırı serbest yağ asitleri ve glukoz beyinde, Langerhans adacıklarının beta hücrelerinde, miyositlerde, hepatositlerde ve adipositlerde glukolipotoksisite oluşturarak ER stresine neden olmaktadır (66). Elde edilen verilerde hem serum trigliserid, kolesterol ve glukoz değerlerinin hem de karaciğerde lipid birikimin anlamlı artmış olması, KD diyeti neticesinde meydana gelen bir glukolipotoksisiteyi işaret etmektedir (Tablo 9). Aynı zamanda KD ile beslenen gruptaki farelerde anlamlı seviyede artan ALT seviyeleri de karaciğer hasarı olduğunu göstermektedir ( $p<0.05$ ) (Tablo 9). Sütten kesilmiş sıçanlarda uygulanan 14 haftalık KD'nin, yetişkinlik döneminde yüksek vücut ağırlığı artışı, artmış adipozite, karaciğer ıslak ağırlığı, hepatik glikojen seviyeleri ve hepatik steatozu indüklediği gösterilmiştir (134). Ayrıca yetişkin sıçanlarda uzun süreli KD'nin vücut yağ kütlelerini, plazma triaçilgliserol ve insülin seviyelerini, hepatik triaçilgliserol ve kolesterol seviyesini arttırdığı ortaya konmuştur (40). Lipid sentezi için önemli bir organel olan ER'de stres gelişmesi, lipid homeoastazının bozulmasına neden olmaktadır. Buna bağlı

olarak karaciğerde IR gelişmektedir (68). IR başlangıçta T2D sırasında hiperglisemiye aracılık ederken, beta hücre kaybına bağlı insülin eksikliği hastalığının gelişimine katkıda bulunmaktadır. Karaciğerde ER stresi, IRE1 aracılı JNK aktivasyonuna neden olmaktadır (135). Aktive JNK, IRS 1 ve 2'nin serin kalıntıları fosforile ederek insülin etkisini bozmaktadır (136). HOMA-IR sonuçlarımız 7,8-DHF'nin, IR direncini azalttığını ve buna bağlı olarak karaciğerde ER stresini baskılayabileceğini göstermektedir (Tablo 9). İnsülin direncini belirlemek için her bir gruptaki farelere OGTT yapıldı ve açlık serum insülin ve glukoz değerlerinden HOMA-IR değeri hesaplandı. OGTT sonuçlarında, KD ile beslenen farelerde glukoz toleransının bozulduğu (Şekil 8, Tablo 10) ve HOMA-IR değerlerinin anlamlı yükseldiği (Tablo 9), 7,8-DHF ile muamele edilen gruplarda ise anlamlı bir düzelme olduğu ortaya konmuştur. 7,8-DHF glukolipotoksisiteyi ve IR'yi azaltma yoluyla ER stresini baskılamış olabilir. Kemirgenlerin kullanıldığı araştırmalarda glukoz tolerans testi, genetik olarak tasarlanmış (örneğin, transgenik veya nakavt) veya diyetle indüklenen bir farenin glukoz intoleransını ve diyabetik olup olmadığını belirlemek için en yaygın kullanılan testtir. Açlık süresi, uygulanma biçimi, glukozun miktarı ve bilinç durumu gibi değişkenlerin farelerde ölçülen glukoz toleransı üzerinde büyük bir etkiye sahip olabileceği açıktır (113). OGTT işlemi genel olarak bir gecelik açlık sonrasında yapılmaktadır. Ancak fareler gece beslenirler, günlük kalori alımlarının %70'ini karanlık döngü sırasında alırlar ve metabolik hızları insanlardan çok daha yüksektir. Bu nedenle bir gecelik açlık, insanlardakine kıyasla fareler için nispeten uzun bir süredir ve daha çok aç kalmaya benzemektedir (137). Farelerdeki OGTT işlemi için uygun doz ve açlık süresini belirlemek için yapılan çalışmada, en uygun açlık süresinin sabah sekizden sonra 6 saatlik açlık süresinin ve 2 mg/kg glukoz dozunun aradaki farkı gözlemlemek için daha uygun olduğu gösterilmiştir (113). Bizde çalışmamızda gündüz altı saatlik açlıktan sonra 2 mg/kg glukoz ile OGTT yapmayı tercih ettik.

Endoplazmik retikulum hem protein katlanması hem de lipid biyosentezi için merkezi bir organeldir ve bu nedenle hepatik lipid homeostazı için önemlidir. IRE1 $\alpha$  aracılı UPR, farmasötik uygulamalara veya aşırı beslenmeye yanıt olarak karaciğeri stresin neden olduğu hepatik lipid birikiminden korumak için gereklidir. IRE1 $\alpha$ , XBP1 yolu aracılığıyla hepatik yağ asidi oksidasyonunu, lipolizi ve anti-inflamatuvar tepkileri artırmak için CHOP ve peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör ailesi üyelerinin ekspresyonunu modüle etmektedir (138). Ancak aşırı aktive olan bir UPR yolu, hepatosit ölümünün başlatılması için kritik bir faktör ve potansiyel bir inflamasyon promotörü haline gelmektedir (83). Yağlı

karaciğerde, reaktif oksijen türlerinin üretimi esas olarak CHOP proteini tarafından oluşturulmaktadır (73). Ayrıca ATF4 ve CHOP, stresli hücrelerde protein sentezini arttırmak için translasyonel bileşenleri kodlayan genleri aktive ederek, reaktif oksijen türlerinin üretiminde ve proteotoksistide bir artışa ve dolayısıyla hücre ölümüne yol açmaktadır (139). 7,8-DHF, hem CHOP ekspresyon ve protein seviyelerini baskılayarak, hem de antioksidan etkisiyle CHOP'un ürettiği reaktif oksijen türlerini süpürerek hücreleri apoptozdan korumuş olabilir.

İnsülin  $\beta$ -hücrelerindeki ER'de proinsülin olarak sentezlenir, aktif formuna dönüştürülerek hücre sitozolündeki granüller içinde depolanır. Kronik hiperglisemi ve periferik insülin direnci gibi nedenlerden ötürü proinsülin sentezindeki artış ve/veya ER'de  $Ca^{2+}$  homeostazının bozulması gibi nedenler ER lümeninde katlanmamış ve/veya yanlış katlanmış insülinin birikmesine neden olur. Bu durum  $\beta$ -hücrelerinde hücre içi sinyal yolu olan UPR'yi aktive eder ve hücre içi homeostaz sağlanmaya çalışılır. Ancak UPR yetersiz kalırsa ER stresi meydana gelir ve hücre apoptoza kadar gider. Sonuç olarak  $\beta$ -hücre kaybı gerçekleşir (73). Oksidatif stres, ER stresi ve inflamatuvar sitokinlerin salgılanması, T2D patogeneğinde önemli bir rol oynar. ER stresinin tek başına  $\beta$ -hücre fonksiyon bozukluğunu ve hatta hücre ölümünü başlatabileceği veya şiddetlendirebileceği gösterilmiştir (140). Yong ve ark. (73) yaptıkları çalışmada, apoptozun bir belirteci olan Chop/Ddit3'ün pankreas  $\beta$  hücrelerindeki delesyonunun, ER stresini hafiflettiğini ve hepatik yağlanmayı azalttığını göstermişlerdir. Yine başka bir çalışmada, diyabetik fare modelinde Chop delesyonunun, oksidatif stresi azalttığı,  $\beta$  hücre fonksiyonunu iyileştirdiği ve hücrelerin hayatta kalmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (141). CHOP, ER stresinde hücre apoptozuna yol açan en sık ölçülen yol (marker protein) olmasına rağmen, tek yol değildir. Yükselmiş GRP78 ve %AI'ya rağmen CHOP seviyeleri arasındaki farkı gözlemleyemediğimizi açıklayabilecek alternatif yollar mevcuttur (66). Ayrıca uzun (16 haftalık) beslenme periyoduna bağlı olarak CHOP seviyeleri yükselmiş ve normal konsantrasyonlara inmiş olabilir. Çalışma kapsamında KD grubunda anlamlı seviyede yüksek bulunan amilaz seviyeleri de, pankreas dokusunda KD neticesinde meydana gelen hasarı göstermektedir (Tablo 9).

Yetişkin insan pankreas adacıkları çok düşük  $\beta$ -hücre döngüsü sergiler veya hiç göstermez. Bu nedenle  $\beta$ -hücre kütlesini ve insülin sekresyon fonksiyonunu (yani 'fonksiyonel  $\beta$ -hücre kütlesi') korumak için proinsülin sentezi ile ilişkili ER stresini azaltmayı amaçlayan müdahaleler, yeni bir T2D tedavisi sağlamak için kullanılabilir (142). 7,8-DHF, ER stresini azaltmak ve hücreleri apoptozdan korumak suretiyle beta hücre hasarını önleyebilir. Yapılan bir çalışmada immünite, vaskülarizasyon ve hücre göçü birçok olayda görev alan vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörünün (VEGFR2) inhibisyonunun NOD farelerde, insülitisi azaltarak ve adacık fonksiyonunu tamir ederek T1DM'de faydalı olabileceği kanaatine varılmıştır (143). Başka bir çalışmada da 7,8-DHF'nin, VEGFR2'ye bağlanarak antagonist etki gösterdiği bildirilmiştir (144). 7,8-DHF'nin pankreas dokusunda ER stresini ve apoptozu baskılamasındaki koruyucu etkileri, VEGFR2 inhibisyonu yoluyla ortaya çıkmış olabilir. İnflamatuvar yanıt, hücre/doku hasarı veya enfeksiyonlar gibi iç veya dış uyaranlara karşı sebebi ortadan kaldırmayı ve hasarı onarmayı amaçlayan koruyucu bir bağışıklık yanıtıdır. Bu yanıt, sitokinler gibi inflamatuvar maddelerin, serbest radikallerin ve hormonların salınmasıyla başlatılır. Lipidler (lipotoksiste) ve karbohidratlar (glukotoksiste) gibi metabolik faktörlerin aşırı ve kronik bir şekilde mevcut olmasının inflamasyonu tetiklediği, bu koşulların aynı zamanda inflamatuvar yanıtı hem aktive edebilen hem de şiddetlendirebilen ER stresini tetiklediği gösterilmiştir. Adipositlerde ER stresinin, glukolipotoksiste ile inflamasyon arasında giderek daha fazla rol aldığı kabul edilmektedir. Adipositlerde doymuş yağ asitleri, ROS üretimi yoluyla ER stresine neden olmaktadır (145). ER stresini azaltabilen 4-fenilbutirat ve tauroursodeoksikolik asit gibi kimyasal şaperonların, obez farelerin adipositlerindeki inflamatuvar yanıtı ve metabolik bozukluğu azalttığı, ER stresinin TNF $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olan NF $\kappa$ B yoluyla adipositlerdeki inflamatuvar yanıtın indüklenmesinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (146). 16 hafta boyunca kafeterya diyetiyle beslenen farelerde inflamatuvar durumu belirlemek için serum IL-1 $\beta$  seviyelerine bakıldı. Kontrol grubuna göre KD grubunda anlamlı artış gösteren IL-1 $\beta$  seviyelerinde, 7,8-DHF uygulamasıyla anlamlı bir azalma olduğu ortaya konuldu ( $p < 0.05$ ) (Tablo 9). IL-23, IL-24, IL-33 gibi bazı sitokinlerin diyabetik beta hücrelerinde oksidatif ve ER stresi indüklediği gösterilmiştir (147). Adipositlerden salgılanan leptinin, beta hücrelerinde IL-1 $\beta$  sekresyonunu uyardığı ve IL-1 $\beta$ 'nin doğal antagonisti olan IL-1Ra'yı baskıladığı (148), ayrıca IL-1 $\beta$ 'nin IRE1/XBP1 yoluyla beta hücrelerinde inflamatuvar yanıtı şiddetlendirdiği gösterilmiştir (149). 7,8-DHF'nin inflamasyonu azaltmadaki bu etkinliği, hücrelerdeki

metabolik yükü azaltmasından, dolayısıyla inflamasyonu hem başlatmada hem de arttırmada rol oynayan ER stresini baskılmasından dolayı meydana gelmiş olduğu değerlendirilmiştir.

Yaptığımız bu çalışmada çözücü olarak kullandığımız DMSO'nun da glukoz ve vücut ağırlığı gibi bazı parametreler üzerinde etkili olduğunu gözlemledik ( Şekil 2, 3 ve Tablo 3). Yapılan bir çalışmada DMSO'nun, özellikle kas ve yağ gibi dokulara glukoz girişinden sorumlu glukoz taşıyıcısı olan GLUT4'ün membrana translokasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (150). DMSO uygulanan grupta serum glukoz değerlerinin azalmasının nedeni bu olabilir. Ayrıca başka bir çalışmada da DMSO'nun 3T3 T mezenkimal kök hücrelerin, adipositlere farklılaşmasını inhibe ettiği de ortaya konulmuştur (151). Her ne kadar DMSO'nun bu parametreler üzerinde azaltıcı bir etkisi olsa da, 7,8-DHF'nin DMSO karşısındaki iyileştirici etkisi bütün parametrelerde daha fazladır. Yine de DMSO'nun özellikle karbohidrat metabolizması üzerindeki etkilerini tam olarak anlayabilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak; kronik ER stresinin diyabet, obezite, kardiyovasküler hastalıklar, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı gibi pek çok metabolik hastalığın patogenezinde rol aldığı artık iyi bilinmektedir. Son bulgular, ER stresinin farmakolojik inhibisyonunun, çeşitli metabolik bozuklukların tedavisi için faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Kafeterya diyetiyle uyarılmış fare metabolik sendrom modelinde, 7,8-DHF hem karaciğerde hem pankreasta ER stresini ve ER stresinin neden olduğu metabolik bozuklukları baskılamıştır. Bu nedenle 7,8-DHF, ER stresini ve ER stresinin neden olduğu metabolik hastalıkları iyileştirmek için uygulanacak terapötik stratejilerde bir yeri olabilir.



## 6. KAYNAKLAR

1. Fahed G, Aoun L, Bou Zerdan M, Allam S, Bou Zerdan M, Bouferraa Y, Assi HI (2022). Metabolic syndrome: Updates on pathophysiology and management in 2021. *Int J Mol Sci* 23(2): 786. doi: 10.3390/ijms23020786.
2. Ajoolabady A, Liu S, Klionsky DJ, Lip GYH, Tuomilehto J, Kavalakatt S, Pereira DM, Samali A, Ren J. ER stress in obesity pathogenesis and management (2022). *Trends Pharmacol Sci* 43(2): 97-109. doi: 10.1016/j.tips.2021.11.011.
3. Vataashchuk MV, Bayliak MM, Hurza VV, Storey KB, Lushchak VI (2022). Metabolic syndrome: Lessons from rodent and drosophila models. *Biomed Res Int* 2022: 5850507. doi: 10.1155/2022/5850507.
4. Sclafani A, Springer D (1976). Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav* 17(3): 461-71. doi: 10.1016/0031-9384(76)90109-8.
5. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L (2011). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 19(6): 1109-17. doi: 10.1038/oby.2011.18.
6. Tripathi YB, Pandey V (2012). Obesity and endoplasmic reticulum (ER) stresses. *Front Immunol* 3: 240. doi: 10.3389/fimmu.2012.00240.
7. Jang SW, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, Wilson WD, Xiao G, Blanchi B, Sun YE, Ye K (2010). A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(6): 2687-92. doi: 10.1073/pnas.0913572107.
8. Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF (2000). BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J* 19(6): 1290-300. doi: 10.1093/emboj/19.6.1290.
9. Duan W, Guo Z, Jiang H, Ware M, Mattson MP (2003). Reversal of behavioral and metabolic abnormalities, and insulin resistance syndrome, by dietary restriction in mice deficient in brain-derived neurotrophic factor. *Endocrinology* 144(6): 2446-53. doi: 10.1210/en.2002-0113.

10. Wurzelmann M, Romeika J, Sun D (2017). Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 12(1): 7-12. doi: 10.4103/1673-5374.198964.
11. Chan CB, Tse MC, Liu X, Zhang S, Schmidt R, Otten R, Liu L, Ye K (2015). Activation of muscular TrkB by its small molecular agonist 7,8-dihydroxyflavone sex-dependently regulates energy metabolism in diet-induced obese mice. *Chem Biol* 22(3):355-68. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.02.003.
12. Wood J, Tse MCL, Yang X, Brobst D, Liu Z, Pang BPS, Chan WS, Zaw AM, Chow BKC, Ye K, Lee CW, Chan CB (2018). BDNF mimetic alleviates body weight gain in obese mice by enhancing mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Metabolism* 87: 113-122. doi: 10.1016/j.metabol.2018.06.007.
13. Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G (2011). Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med* 9: 48. doi: 10.1186/1741-7015-9-48.
14. Reaven GM. Banting lecture 1988 (1988). Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37(12): 1595-607. doi: 10.2337/diab.37.12.1595.
15. Alberti KG, Zimmet PZ (1988). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15(7): 539-53.
16. Balkau B, Charles MA (1999). Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med* 16(5): 442-3. doi: 10.1046/j.1464-5491.1999.00059.x.
17. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (2001). Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285(19): 2486-97. doi: 10.1001/jama.285.19.2486.
18. Grundy SM, Cleeman JJ, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ (2004). Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation* 110(2): 227-39. doi: 10.1161/01.CIR.0000133317.49796.0E.

19. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J (2006). Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 23(5): 469-80. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x.
20. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation task force on epidemiology and prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120(16): 1640-5. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
21. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)* 13: 65. doi: 10.1186/s12986-016-0123-9.
22. Aguilar M, Bhuket T, Torres S, Liu B, Wong RJ (2015). Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012. *JAMA* 313(19): 1973-4. doi: 10.1001/jama.2015.4260.
23. Gao W; DECODE Study Group (2008). Does the constellation of risk factors with and without abdominal adiposity associate with different cardiovascular mortality risk? *Int J Obes (Lond)* 32(5): 757-62. doi: 10.1038/sj.ijo.0803797.
24. Mabry RM, Reeves MM, Eakin EG, Owen N (2010). Gender differences in prevalence of the metabolic syndrome in Gulf Cooperation Council Countries: a systematic review. *Diabet Med* 27(5): 593-7. doi: 10.1111/j.1464-5491.2010.02998.x.
25. Liu M, Wang J, Jiang B, Sun D, Wu L, Yang S, Wang Y, Li X, He Y (2013). Increasing prevalence of metabolic syndrome in a Chinese elderly population: 2001-2010. *PLoS One* 8(6): e66233. doi: 10.1371/journal.pone.0066233.
26. Onat A, Yüksel M, Koroğlu B, Gümrükçüoğlu HA, Aydın M, Cakmak HA, Karagöz A, Can G (2013). TEKHARF 2012: Genel ve koroner mortalite ile metabolik sendrom prevalansı eğilimleri (Turkish Adult Risk Factor Study survey 2012: overall and coronary mortality and trends in the prevalence of metabolic syndrome). *Turk Kardiyol Dern Ars.* 41(5): 373-8. Turkish. doi: 10.5543/tkda.2013.15853.

27. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P (2003). Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes* 52(12): 2882-7. doi: 10.2337/diabetes.52.12.2882.
28. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46(11): 2347-55. doi: 10.1194/jlr.M500294-JLR200.
29. Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S (2005). Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(5): H2031-41. doi: 10.1152/ajpheart.01058.2004.
30. 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):1752-61. doi: 10.1172/JCI21625.
31. DeVallance E, Li Y, Jurczak MJ, Cifuentes-Pagano E, Pagano PJ (2019). The role of NADPH oxidases in the etiology of obesity and metabolic syndrome: contribution of individual isoforms and cell biology. *Antioxid Redox Signal* 31(10): 687-709. doi: 10.1089/ars.2018.7674.
32. Srikanthan K, Feyh A, Visweshwar H, Shapiro JI, Sodhi K (2016). Systematic review of metabolic syndrome biomarkers: a panel for early detection, management, and risk stratification in the West Virginian Population. *Int J Med Sci* 13(1): 25-38. doi: 10.7150/ijms.13800.
33. Panchal SK, Brown L (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011: 351982. doi: 10.1155/2011/351982.
34. Senaphan K, Kukongviriyapan U, Sangartit W, Pakdeechote P, Pannangpetch P, Prachaney P, Greenwald SE, Kukongviriyapan V (2015). Ferulic acid alleviates changes in a rat model of metabolic syndrome induced by high-carbohydrate, high-fat diet. *Nutrients* 7(8): 6446-64. doi: 10.3390/nu7085283.
35. Suman RK, Ray Mohanty I, Borde MK, Maheshwari U, Deshmukh YA (2016). Development of an experimental model of diabetes co-existing with metabolic syndrome in rats. *Adv Pharmacol Sci* 2016: 9463476. doi: 10.1155/2016/9463476.

36. Fujita Y, Maki K (2016). High-fat diet-induced obesity triggers alveolar bone loss and spontaneous periodontal disease in growing mice. *BMC Obes* 3: 1. doi: 10.1186/s40608-016-0082-8.
37. Kasim-Karakas SE, Vriend H, Almario R, Chow LC, Goodman MN (1996). Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. *J Lab Clin Med* 128(2): 208-13. doi: 10.1016/s0022-2143(96)90013-x.
38. Lanza JF, Snoeren EMS. The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior (2021). *Neurosci Biobehav Rev* 122:92-119. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.11.003.
39. Volkow ND, Wise RA, Baler R (2017) . The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nat Rev Neurosci* 18(12): 741-752. doi: 10.1038/nrn.2017.130.
40. Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, Corbett D (2016). A physiological characterization of the cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiol Behav* 167: 382-391. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.09.029.
41. Lanza JF, Caimari A, del Bas JM, Torregrosa D, Cigarroa I, Pallàs M, Capdevila L, Arola L, Escorihuela RM (2014). Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PLoS One* 9(1): e85049. doi: 10.1371/journal.pone.0085049.
42. Lewis AR, Singh S, Youssef FF (2019). Cafeteria-diet induced obesity results in impaired cognitive functioning in a rodent model. *Heliyon* 5(3): e01412. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01412.
43. Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W, Torres IL (2012). Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides* 38(1): 189-96. doi: 10.1016/j.peptides.2012.08.007.
44. Mucellini AB, Goularte JF, de Araujo da Cunha AC, Caceres RC, Noschang C, da Silva Benetti C, Silveira PP, Sanvitto GL (2014). Effects of exposure to a cafeteria diet during gestation and after weaning on the metabolism and body weight of adult male offspring in rats. *Br J Nutr* 111(8): 1499-506. doi: 10.1017/S0007114513003838.

45. Buyukdere Y, Gulec A, Akyol A (2019). Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. *PeerJ* 7: e6656. doi: 10.7717/peerj.6656.
46. Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH (2015). Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflamm Res* 64(7): 501-12. doi: 10.1007/s00011-015-0831-z.
47. Oliva L, Aranda T, Caviola G, Fernández-Bernal A, Alemany M, Fernández-López JA, Remesar X (2017). In rats fed high-energy diets, taste, rather than fat content, is the key factor increasing food intake: a comparison of a cafeteria and a lipid-supplemented standard diet. *PeerJ* 5: e3697. doi: 10.7717/peerj.3697.
48. Moore BJ (1987). The cafeteria diet--an inappropriate tool for studies of thermogenesis. *J Nutr* 117(2): 227-31. doi: 10.1093/jn/117.2.227.
49. Shafat A, Murray B, Rumsey D (2009). Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite* 52(1): 34-8. doi: 10.1016/j.appet.2008.07.004.
50. Martire SI, Maniam J, South T, Holmes N, Westbrook RF, Morris MJ (2014). Extended exposure to a palatable cafeteria diet alters gene expression in brain regions implicated in reward, and withdrawal from this diet alters gene expression in brain regions associated with stress. *Behav Brain Res* 265: 132-41. doi: 10.1016/j.bbr.2014.02.027.
51. Li C, Qian T, He R, Wan C, Liu Y, Yu H (2021). Endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites: regulators, mechanisms, and physiological functions. *Front Cell Dev Biol* 9: 627700. doi: 10.3389/fcell.2021.627700.
52. Adams CJ, Kopp MC, Larburu N, Nowak PR, Ali MMU (2019). Structure and molecular mechanism of ER stress signaling by the unfolded protein response signal activator IRE1. *Front Mol Biosci* 6: 11. doi: 10.3389/fmolb.2019.00011.
53. Almanza A, Carlesso A, Chintia C, Creedican S, Doultisinos D, Leuzzi B, Luís A, McCarthy N, Montibeller L, More S, Papaioannou A, Püschel F, Sassano ML, Skoko J, Agostinis P, de Belleruche J, Eriksson LA, Fulda S, Gorman AM, Healy S, Kozlov A, Muñoz-Pinedo C, Rehm M, Chevet E, Samali A (2018). Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J* (2): 241-278. doi: 10.1111/febs.14608.

54. Hwang J, Qi L (2018). Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci* 43(8): 593-605. doi: 10.1016/j.tibs.2018.06.005.
55. Chadwick SR, Lajoie P (2019) . Endoplasmic reticulum stress coping mechanisms and lifespan regulation in health and diseases. *Front Cell Dev Biol* 7: 84. doi: 10.3389/fcell.2019.00084.
56. Hager L, Li L, Pun H, Liu L, Hossain MA, Maguire GF, Naples M, Baker C, Magomedova L, Tam J, Adeli K, Cummins CL, Connelly PW, Ng DS (2012). Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency protects against cholesterol-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in mice. *J Biol Chem* 287(24): 20755-68. doi: 10.1074/jbc.M112.340919.
57. Lemmer IL, Willemsen N, Hilal N, Bartelt A (2021). A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Mol Metab* 47: 101169. doi: 10.1016/j.molmet.2021.101169.
58. Mohan S, R PRM, Brown L, Ayyappan P, G RK (2019). Endoplasmic reticulum stress: A master regulator of metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol* 860: 172553. doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172553.
59. Wu J, He GT, Zhang WJ, Xu J, Huang QB (2016). IRE1 $\alpha$  signaling pathways involved in mammalian cell fate determination. *Cell Physiol Biochem* 38(3): 847-58. doi: 10.1159/000443039.
60. Balsa E, Soustek MS, Thomas A, Cogliati S, García-Poyatos C, Martín-García E, Jedrychowski M, Gygi SP, Enriquez JA, Puigserver P (2019). ER and nutrient stress promote assembly of respiratory chain supercomplexes through the PERK-eIF2 $\alpha$  axis. *Mol Cell* 74(5): 877-890.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2019.03.031.
61. Marciniak SJ, Chambers JE, Ron D (2022). Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease. *Nat Rev Drug Discov* 21(2): 115-140. doi: 10.1038/s41573-021-00320-3.
62. Biason-Lauber A, Lang-Muritano M, Vaccaro T, Schoenle EJ (2002). Loss of kinase activity in a patient with Wolcott-Rallison syndrome caused by a novel mutation in the EIF2AK3 gene. *Diabetes* 51(7): 2301-5. doi: 10.2337/diabetes.51.7.2301.

63. Kim OK, Jun W, Lee J (2015). Mechanism of ER stress and inflammation for hepatic insulin resistance in obesity. *Ann Nutr Metab* 67(4): 218-27. doi: 10.1159/000440905.
64. Piperi C, Adamopoulos C, Dalagiorgou G, Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG (2012). Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7): 2231-42. doi: 10.1210/jc.2011-34.
65. Kaneko M, Imaizumi K, Saito A, Kanemoto S, Asada R, Matsuhisa K, Ohtake Y (2017). ER Stress and disease: toward prevention and treatment. *Biol Pharm Bull* 40(9): 1337-1343. doi: 10.1248/bpb.b17-00342.
66. Ghemrawi R, Battaglia-Hsu SF, Arnold C (2018). Endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Cells*. 2018 Jun 19;7(6):63. doi: 10.3390/cells7060063.
67. Cao SS, Kaufman RJ (2013). Targeting endoplasmic reticulum stress in metabolic disease. *Expert Opin Ther Targets* 17(4): 437-48. doi: 10.1517/14728222.2013.756471.
68. Wang S, Kaufman RJ (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 197(7): 857-67. doi: 10.1083/jcb.201110131.
69. Danilova T, Lindahl M (2018). Emerging roles for mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) in pancreatic beta cells and diabetes. *Front Physiol* 9: 1457. doi: 10.3389/fphys.2018.01457.
70. Zhang IX, Raghavan M, Satin LS (2020). The Endoplasmic reticulum and calcium homeostasis in pancreatic beta cells. *Endocrinology* 161(2): bqz028. doi: 10.1210/endocr/bqz028.
71. Papa FR (2012). Endoplasmic reticulum stress, pancreatic  $\beta$ -cell degeneration, and diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(9): a007666. doi: 10.1101/cshperspect.a007666.
72. Zhang W, Feng D, Li Y, Iida K, McGrath B, Cavener DR (2006). PERK EIF2AK3 control of pancreatic beta cell differentiation and proliferation is required for postnatal glucose homeostasis. *Cell Metab* 4(6): 491-7. doi: 10.1016/j.cmet.2006.11.002.



73. Yong J, Parekh VS, Reilly SM, Nayak J, Chen Z, Lebeaupin C, Jang I, Zhang J, Prakash TP, Sun H, Murray S, Guo S, Ayala JE, Satin LS, Saltiel AR, Kaufman RJ (2021). Chop/Ddit3 depletion in  $\beta$  cells alleviates ER stress and corrects hepatic steatosis in mice. *Sci Transl Med* 13(604): eaba9796. doi: 10.1126/scitranslmed.aba9796.
74. Han J, Kaufman RJ (2016). The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J Lipid Res* 57(8): 1329-38. doi: 10.1194/jlr.R067595.
75. Achard CS, Laybutt DR (2012). Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in liver cells results in two distinct outcomes: adaptation with enhanced insulin signaling or insulin resistance. *Endocrinology* 153(5): 2164-77. doi: 10.1210/en.2011-1881.
76. Lagace TA, Ridgway ND (2013). The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1833(11): 2499-510. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.05.018.
77. Lewy TG, Grabowski JM, Bloom ME (2017). BiP: master regulator of the unfolded protein response and crucial factor in flavivirus biology. *Yale J Biol Med* 90(2):291-300.
78. Moncan M, Mnich K, Blomme A, Almanza A, Samali A, Gorman AM (2021). Regulation of lipid metabolism by the unfolded protein response. *J Cell Mol Med* 25(3): 1359-1370. doi: 10.1111/jcmm.16255.
79. Thoudam T, Jeon JH, Ha CM, Lee IK (2016). Role of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane in inflammation-mediated metabolic diseases. *Mediators Inflamm* 2016: 1851420. doi: 10.1155/2016/1851420.
80. Zha BS, Zhou H (2012). ER stress and lipid metabolism in adipocytes. *Biochem Res Int* 2012: 312943. doi: 10.1155/2012/312943.
81. Boden G, Merali S (2011). Measurement of the increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Methods Enzymol* 489: 67-82. doi: 10.1016/B978-0-12-385116-1.00004-2.
82. Zhou Y, Tong Z, Jiang S, Zheng W, Zhao J, Zhou X (2020). The Roles of endoplasmic reticulum in NLRP3 inflammasome activation. *Cells* 9(5): 1219. doi: 10.3390/cells9051219.

83. Rutkowski DT (2019). Liver function and dysfunction - a unique window into the physiological reach of ER stress and the unfolded protein response. *FEBS J* 286(2): 356-378. doi: 10.1111/febs.14389.
84. Baiceanu A, Mesdom P, Lagouge M, Foufelle F (2016). Endoplasmic reticulum proteostasis in hepatic steatosis. *Nat Rev Endocrinol* 12(12):710-722. doi: 10.1038/nrendo.2016.
85. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci* 75(18): 3313-3327. doi: 10.1007/s00018-018-2860-6.
86. Sarvani C, Sireesh D, Ramkumar KM (2017). Unraveling the role of ER stress inhibitors in the context of metabolic diseases. *Pharmacol Res* 119: 412-421. doi: 10.1016/j.phrs.2017.02.018.
87. Lu X, Huang H, Fu X, Chen C, Liu H, Wang H, Wu D (2022). The role of endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome in liver disorders. *Int J Mol Sci* 23(7): 3528. doi: 10.3390/ijms23073528.
88. Zhang G, Yang W, Jiang F, Zou P, Zeng Y, Ling X, Zhou Z, Cao J, Ao L (2019). PERK regulates Nrf2/ARE antioxidant pathway against dibutyl phthalate-induced mitochondrial damage and apoptosis dependent of reactive oxygen species in mouse spermatocyte-derived cells. *Toxicol Lett* 308: 24-33. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.03.007.
89. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol* 15(5): 481-90. doi: 10.1038/ncb2738.
90. Suganya N, Bhakkiyalakshmi E, Suriyanarayanan S, Paulmurugan R, Ramkumar KM (2014). Quercetin ameliorates tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Cell Prolif* 47(3): 231-40. doi: 10.1111/cpr.12102.

91. Wang M, Meng XB, Yu YL, Sun GB, Xu XD, Zhang XP, Dong X, Ye JX, Xu HB, Sun YF, Sun XB (2014). Elatoside C protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes through the reduction of endoplasmic reticulum stress partially depending on STAT3 activation. *Apoptosis* 19(12): 1727-35. doi: 10.1007/s10495-014-1039-3.
92. Prola A, Pires Da Silva J, Guilbert A, Lecru L, Piquereau J, Ribeiro M, Mateo P, Gressette M, Fortin D, Boursier C, Gallerne C, Caillard A, Samuel JL, François H, Sinclair DA, Eid P, Ventura-Clapier R, Garnier A, Lemaire C (2017). SIRT1 protects the heart from ER stress-induced cell death through eIF2 $\alpha$  deacetylation. *Cell Death Differ* 24(2): 343-356. doi: 10.1038/cdd.2016.138.
93. Zhao GL, Yu LM, Gao WL, Duan WX, Jiang B, Liu XD, Zhang B, Liu ZH, Zhai ME, Jin ZX, Yu SQ, Wang Y (2016). Berberine protects rat heart from ischemia/reperfusion injury via activating JAK2/STAT3 signaling and attenuating endoplasmic reticulum stress. *Acta Pharmacol Sin* 37(3): 354-67. doi: 10.1038/aps.2015.136.
94. Choy KW, Murugan D, Mustafa MR (2018). Natural products targeting ER stress pathway for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Res* 132: 119-129. doi: 10.1016/j.phrs.2018.04.013.
95. Huang EJ, Reichardt LF (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72: 609-42. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629.
96. Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H (2010). BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol Histopathol* 25(2): 237-58. doi: 10.14670/HH-25.237.
97. Rosas-Vargas H, Martínez-Ezquerro JD, Bienvenu T (2011). Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Arch Med Res* 42(6): 482-94. doi: 10.1016/j.arcmed.2011.09.005.
98. Tsuchida A, Nonomura T, Nakagawa T, Itakura Y, Ono-Kishino M, Yamanaka M, Sogaru E, Taiji M, Noguchi H (2002). Brain-derived neurotrophic factor ameliorates lipid metabolism in diabetic mice. *Diabetes Obes Metab* 4(4): 262-9. doi: 10.1046/j.1463-1326.2002.00206.x.

99. Rozanska O, Uruska A, Zozulinska-Ziolkiewicz D (2020). Brain-Derived Neurotrophic Factor and Diabetes. *Int J Mol Sci* 21(3): 841. doi: 10.3390/ijms21030841.
100. Krabbe KS, Nielsen AR, Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Rasmussen P, Erikstrup C, Fischer CP, Lindegaard B, Petersen AM, Taudorf S, Secher NH, Pilegaard H, Bruunsgaard H, Pedersen BK (2007). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia* 50(2): 431-8. doi: 10.1007/s00125-006-0537-4.
101. Eyileten C, Kaplon-Cieslicka A, Mirowska-Guzel D, Malek L, Postula M (2017). Antidiabetic effect of brain-derived neurotrophic factor and its association with inflammation in type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res* 2017: 2823671. doi: 10.1155/2017/2823671.
102. Wurzelmann M, Romeika J, Sun D (2017). Therapeutic potential of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and a small molecular mimics of BDNF for traumatic brain injury. *Neural Regen Res* 12(1): 7-12. doi: 10.4103/1673-5374.198964.
103. Lim W, Bae H, Bazer FW, Song G (2017). Brain-derived neurotrophic factor improves proliferation of endometrial epithelial cells by inhibition of endoplasmic reticulum stress during early pregnancy. *J Cell Physiol* 232(12): 3641-3651. doi: 10.1002/jcp.25834.
104. Cırrık S, Hacıoglu G, Abidin İ, Aydın-Abidin S, Noyan T (2019). Endoplasmic reticulum stress in the livers of BDNF heterozygous knockout mice. *Arch Physiol Biochem* 125(4): 378-386. doi: 10.1080/13813455.2018.
105. Yu X, Liu Q, Wang X, Liu H, Wang Y (2018). 7,8-Dihydroxyflavone ameliorates high-glucose induced diabetic apoptosis in human retinal pigment epithelial cells by activating TrkB. *Biochem Biophys Res Commun* 495(1): 922-927. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.007.
106. Ma R, Zhang J, Liu X, Yue S, Zhao Q, Xu Y (2016). 7,8-DHF treatment induces CYR61 expression to suppress hypoxia induced er stress in HK-2 cells. *Biomed Res Int* 2016: 5029797. doi: 10.1155/2016/5029797.

107. Cho SJ, Kang KA, Piao MJ, Ryu YS, Fernando PDSM, Zhen AX, Hyun YJ, Ahn MJ, Kang HK, Hyun JW (2019). 7,8-Dihydroxyflavone protects high glucose-damaged neuronal cells against oxidative stress. *Biomol Ther (Seoul)* 27(1): 85-91. doi: 10.4062/biomolther.2018.202.
108. Pandey SN, Kwatra M, Dwivedi DK, Choubey P, Lahkar M, Jangra A (2020). 7,8-Dihydroxyflavone alleviated the high-fat diet and alcohol-induced memory impairment: behavioral, biochemical and molecular evidence. *Psychopharmacology (Berl)* 237(6): 1827-1840. doi: 10.1007/s00213-020-05502-2.
109. Holemans K, Caluwaerts S, Poston L, Van Assche FA (2004). Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 190(3): 858-65. doi: 10.1016/j.ajog.2003.09.025.
110. Research diets (2023). How much diet do you need ? (online). Available from: <https://www.researchdiets.com/opensource-diets/in-stock-diets>. (Accessed 03 February 2023).
111. Della Vedova MC, Muñoz MD, Santillan LD, Plateo-Pignatari MG, Germanó MJ, Rinaldi Tosi ME, Garcia S, Gomez NN, Fornes MW, Gomez Mejiba SE, Ramirez DC (2016). A Mouse model of diet-induced obesity resembling most features of human metabolic syndrome. *Nutr Metab Insights* 9: 93-102. doi: 10.4137/NMI.S32907.
112. Garg MK, Dutta MK, Mahalle N. Study of beta-cell function (by HOMA model) in metabolic syndrome. *Indian J Endocrinol Metab* 15(Suppl 1): S44-9. doi: 10.4103/2230-8210.83059.
113. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(6): E1323-32. doi: 10.1152/ajpendo.90617.2008.
114. Choi KM, Lee YS, Shin DM, Lee S, Yoo KS, Lee MK, Lee JH, Kim SY, Lee YM, Hong JT, Yun YP, Yoo HS (2013). Green tomato extract attenuates high-fat-diet-induced obesity through activation of the AMPK pathway in C57BL/6 mice. *J Nutr Biochem* 24(1): 335-42. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.06.018.
115. Mopuri R, Kalyesubula M, Rosov A, Edery N, Moallem U, Dvir H (2021). Improved Folch method for liver-fat quantification. *Front Vet Sci* 7: 594853. doi: 10.3389/fvets.2020.594853

116. Gevertz JL, Dunn SM, Roth CM (2005). Mathematical model of real-time PCR kinetics. *Biotechnol Bioeng* 92(3): 346-55. doi: 10.1002/bit.20617.
117. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25(4): 402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
118. Sag S, Imamoglu M, Sarihan H, Yulug E, Alver A, Geze Saatci S, Cay A (2021). Effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on exocrine and endocrine functions, and oxidative state of rat pancreas. *Biotech Histochem* 96(4): 257-262. doi: 10.1080/10520295.2020.
119. Saral Ö, Yildiz O, Aliyazicioğlu R, Yuluğ E, Canpolat S, Öztürk F, Kolaylı S (2016). Apitherapy products enhance the recovery of CCL4-induced hepatic damages in rats. *Turk J Med Sci* 46(1): 194-202. doi: 10.3906/sag-1411-35.
120. De Faveri A, De Faveri R, Broering MF, Bousfield IT, Goss MJ, Muller SP, Pereira RO, de Oliveira E Silva AM, Machado ID, Quintão NLM, Santin JR (2020). Effects of passion fruit peel flour (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.) in cafeteria diet-induced metabolic disorders. *J Ethnopharmacol* 250: 112482. doi: 10.1016/j.jep.2019.
121. Yıldız O, Can Z, Saral O, Yuluğ E, Öztürk F, Aliyazicioğlu R, Canpolat S, Kolaylı S (2013). Hepatoprotective potential of chestnut bee pollen on carbon tetrachloride-induced hepatic damages in rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 461478. doi: 10.1155/2013/461478.
122. Sahin E, Saglam N, Erdem S, Alvuroglu E, Abidin I, Yulug E, Alver A (2022). 7,8-Dihydroxyflavone alleviates Endoplasmic Reticulum Stress in cafeteria diet-induced metabolic syndrome. *Life Sci* 306: 120781. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120781.
123. Shimoke K, Utsumi T, Kishi S, Nishimura M, Sasaya H, Kudo M, Ikeuchi T (2004). Prevention of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *Brain Res* 1028(1): 105-11. doi: 10.1016/j.brainres.2004.09.005.
124. Chen G, Fan Z, Wang X, Ma C, Bower KA, Shi X, Ke ZJ, Luo J (2007). Brain-derived neurotrophic factor suppresses tunicamycin-induced upregulation of CHOP in neurons. *J Neurosci Res* 85(8): 1674-84. doi: 10.1002/jnr.21292.

125. Lim W, Bae H, Bazer FW, Song G (2017). Brain-derived neurotrophic factor improves proliferation of endometrial epithelial cells by inhibition of endoplasmic reticulum stress during early pregnancy. *J Cell Physiol* 232(12): 3641-3651. doi: 10.1002/jcp.25834.
126. Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M (2012). Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin* 33(2): 173-81. doi: 10.1038/aps.2011.203.
127. Leigh SJ, Kendig MD, Morris MJ (2019). Palatable Western-style cafeteria diet as a reliable method for modeling diet-induced obesity in rodents. *J Vis Exp* 153: e60262. doi: 10.3791/60262.
128. Higa TS, Spinola AV, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS (2014). Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 6(1): 47-54.
129. Johnson AR, Wilkerson MD, Sampey BP, Troester MA, Hayes DN, Makowski L (2016). Cafeteria diet-induced obesity causes oxidative damage in white adipose. *Biochem Biophys Res Commun* 473(2): 545-50. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.113.
130. Liu X, Chan CB, Jang SW, Pradoldej S, Huang J, He K, Phun LH, France S, Xiao G, Jia Y, Luo HR, Ye K (2010). A synthetic 7,8-dihydroxyflavone derivative promotes neurogenesis and exhibits potent antidepressant effect. *J Med Chem* (23): 8274-86. doi: 10.1021/jm101206p.
131. Guarino A, Bettgazzi B, Aziz N, Barbieri M, Bochicchio D, Crippa L, Marino P, Sguizzato M, Soukupova M, Zucchini S, Simonato M (2022). Low-dose 7,8-Dihydroxyflavone administration after status epilepticus prevents epilepsy development. *Neurotherapeutics* 19(6): 1951-1965. doi: 10.1007/s13311-022-01299-4.
132. Chen C, Wang Z, Zhang Z, Liu X, Kang SS, Zhang Y, Ye K (2018). The prodrug of 7,8-dihydroxyflavone development and therapeutic efficacy for treating Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(3): 578-583. doi: 10.1073/pnas.1718683115.
133. Templeman NM, Skovsø S, Page MM, Lim GE, Johnson JD (2017). A causal role for hyperinsulinemia in obesity. *J Endocrinol* 232(3): R173-R183. doi: 10.1530/JOE-16-0449.

134. Maeda Júnior AS, Constantin J, Utsunomiya KS, Gilglioni EH, Gasparin FRS, Carreño FO, de Moraes SMF, Rocha M, Natali MRM, Ghizoni CVC, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL, Constantin RP (2018). Cafeteria diet feeding in young rats leads to hepatic steatosis and increased gluconeogenesis under fatty acids and glucagon influence. *Nutrients* 10(11): 1571. doi: 10.3390/nu10111571.
136. Bhuvaneswari S, Yogalakshmi B, Sreeja S, Anuradha CV (2014). Astaxanthin reduces hepatic endoplasmic reticulum stress and nuclear factor- $\kappa$ B-mediated inflammation in high fructose and high fat diet-fed mice. *Cell Stress Chaperones* 19(2): 183-91. doi: 10.1007/s12192-013-0443-x.
137. Yung JHM, Giacca A (2020). Role of c-jun n-terminal kinase (jnk) in obesity and type 2 diabetes. *Cells* 9(3): 706. doi: 10.3390/cells9030706.
138. Ayala JE, Bracy DP, McGuinness OP, Wasserman DH (2006). Considerations in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse. *Diabetes* 55(2): 390-7. doi: 10.2337/diabetes.55.02.06.db05-0686.
139. Zhang K, Wang S, Malhotra J, Hassler JR, Back SH, Wang G, Chang L, Xu W, Miao H, Leonardi R, Chen YE, Jackowski S, Kaufman RJ (2011). The unfolded protein response transducer IRE1 $\alpha$  prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *EMBO J* 30(7): 1357-75. doi: 10.1038/emboj.2011.52.
139. Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell* 15(5): 481-90. doi: 10.1038/ncb2738.
140. Burgos-Morón E, Abad-Jiménez Z, Marañón AM, Iannantuoni F, Escribano-López I, López-Domènech S, Salom C, Jover A, Mora V, Roldan I, Solá E, Rocha M, Víctor VM (2019). Relationship between oxidative stress, er stress, and inflammation in type 2 diabetes: the battle continues. *J Clin Med* 8(9): 1385. doi: 10.3390/jcm8091385.
141. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ (2008). Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest* 118(10): 3378-89. doi: 10.1172/JCI34587.
142. Boland BB, Rhodes CJ, Grimsby JS (2017). The dynamic plasticity of insulin production in  $\beta$ -cells. *Mol Metab* 6(9): 958-973. doi: 10.1016/j.molmet.2017.04.010.



143. Villalta SA, Lang J, Kubeck S, Kabre B, Szot GL, Calderon B, Wasserfall C, Atkinson MA, Brekken RA, Pullen N, Arch RH, Bluestone JA (2013). Inhibition of VEGFR-2 reverses type 1 diabetes in NOD mice by abrogating insulinitis and restoring islet function. *Diabetes* 62(8): 2870-8. doi: 10.2337/db12-1619.
144. Chitranshi N, Gupta V, Kumar S, Graham SL (2015). Exploring the molecular interactions of 7,8-dihydroxyflavone and its derivatives with TrkB and VEGFR2 proteins. *Int J Mol Sci* 16(9): 21087-108. doi: 10.3390/ijms160921087.
145. Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K (2012). Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci Rep* 2: 799. doi: 10.1038/srep00799.
146. Chen Y, Wu Z, Zhao S, Xiang R (2016). Chemical chaperones reduce ER stress and adipose tissue inflammation in high fat diet-induced mouse model of obesity. *Sci Rep* 6: 27486. doi: 10.1038/srep27486.
147. Hasnain SZ, Borg DJ, Harcourt BE, Tong H, Sheng YH, Ng CP, Das I, Wang R, Chen AC, Loudovaris T, Kay TW, Thomas HE, Whitehead JP, Forbes JM, Prins JB, McGuckin MA (2014). Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. *Nat Med* 20(12): 1417-26. doi: 10.1038/nm.3705.
148. Maedler K, Sergeev P, Ehses JA, Mathe Z, Bosco D, Berney T, Dayer JM, Reinecke M, Halban PA, Donath MY (2004). Leptin modulates beta cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1 $\beta$  in human islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21): 8138-43. doi: 10.1073/pnas.0305683101.
149. Miani M, Barthson J, Colli ML, Brozzi F, Cnop M, Eizirik DL (2013). Endoplasmic reticulum stress sensitizes pancreatic beta cells to interleukin-1 $\beta$ -induced apoptosis via Bim/A1 imbalance. *Cell Death Dis* 4(7): e701. doi: 10.1038/cddis.2013.236.
150. Berenguer M, Zhang J, Bruce MC, Martinez L, Gonzalez T, Gurtovenko AA, Xu T, Le Marchand-Brustel Y, Govers R (2011). Dimethyl sulfoxide enhances GLUT4 translocation through a reduction in GLUT4 endocytosis in insulin-stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Biochimie* 93(4):697-709. doi: 10.1016/j.biochi.2010.12.013.

151. Wang H, Scott RE (1993). Inhibition of distinct steps in the adipocyte differentiation pathway in 3T3 T mesenchymal stem cells by dimethyl sulphoxide (DMSO). *Cell Prolif* 26(1): 55-66. doi: 10.1111/j.1365-2184.1993.tb00006.x.



## EKLER



## YAYINLAR

1. Yazıcı E, **Şahin E**, Alvuroğlu E, Yuluğ E, Menteşe A (2023). Bergamottin reduces liver damage by suppressing inflammation, endoplasmic reticulum and oxidative stress in cafeteria diet-fed mice. *Food Bioscience* 52: 102371.
2. **Sahin E**, Saglam N, Erdem S, Alvuroglu E, Abidin I, Yulug E, Alver A (2022). 7,8-Dihydroxyflavone alleviates Endoplasmic Reticulum Stress in cafeteria diet-induced metabolic syndrome. *Life Sci* 306: 120781.
3. Yardimci A, Ulker N, Bulmus O, **Sahin E**, Alver A, Gungor IH, Turk G, Artas G, Kaya Tektemur N, Ozcan M, Kelestimur H, Canpolat S (2022). Irisin improves high-fat diet-induced sexual dysfunction in obese male rats. *Neuroendocrinology* 112(11): 1087-1103.
4. Canpolat S, Ulker N, Yardimci A, Tancan E, **Sahin E**, Yaman SO, Bulmuş O, Alver A, Ozcan M (2022). Irisin ameliorates male sexual dysfunction in paroxetine-treated male rats. *Psychoneuroendocrinology* 136: 105597.
5. Yilmaz O, Sivrikaya EC, Kocak N, **Sahin E**, Tuzuner T, Alver A, Korkmaz YT (2022). Evaluation of brain-derived neurotrophic factor and cortisol levels in patients with bruxism. *Ann Med Res* 29(10): 1146–1150.
6. Topal M, Us Altay D, **Şahin E**, Alver A (2022). The Effects of ciglitazone on enzyme activities of carbonic anhydrase II and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 11(1): 105-111.
7. Keser H, Doğramacı Ş, **Şahin E**, Sağlam N, Erdem M, Alver A, Aydın-Abidin S (2020). The TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone improves sensory-motor performance and reduces lipid peroxidation in old mice. *Gen Physiol Biophys* 39(5): 471-479.
8. Ozer V, Karaca Y, Gunaydin M, Ozer S, Sahin M, Karahan SC, **Sahin E**, Sahin A, Gunduz A (2019). Serum irisin levels in patients with acute atrial fibrillation. *Signa Vitae* 15(2): 34-38.
9. **Şahin E**, Altay DU (2018). Yeni tanı almış metformin kullanan tip 2 diyabetes mellituslu hastalarda serum irisin seviyelerinin incelenmesi. *Dicle Tıp Dergisi* 45(1): 43-49.
10. Tatli O, Kurt NB, Karaca Y, Sahin A, Aygün A, **Sahin E**, Katipoglu B, Eryigit U, Turkmen S (2017). The diagnostic value of serum pentraxin 3 levels in pulmonary contusion. *Am J Emerg Med* 35(3): 425-428.

## BİLDİRİLER

1. Şahin S, Gürgen SG, **Şahin E** (2021). D vitamininin nöbetle ilişkili hipokampal enflamasyon üzerine koruyucu etkisi. 43. Pediatri Günleri, İstanbul, Türkiye, 30 Mayıs - 02 Haziran 2021.
2. **Şahin E**, Altay DU, Handırı E (2020). Aprotininli ve aprotininsiz serum ve plazma örneklerinde irisin seviyesinin belirlenmesi. 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, Gaziantep, Türkiye, 18 - 20 Aralık 2020.
3. Yalduz F, Sağlam N, **Şahin E**, Alver A (2020). *De Novo* lipogenezde beyin kaynaklı nörotrofik faktör ile asetil coa karboksilaz arasındaki ilişkinin incelenmesi. 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, Gaziantep, Türkiye, 18 - 20 Aralık 2020.
4. Sağlam N, **Şahin E**, Alver A, Mentşe A (2020). Oleuropeinin RAW264.7 hücre serisinde CD36 gen ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi. 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, Gaziantep, Türkiye, 18 - 20 Aralık 2020.
6. **Şahin E**, Sağlam N, Doğramacı Ş, Alver A (2020). Bir BDNF Agonisti Olan 7,8-dihidroksiflavon (7,8-DHF) yaşlı farelerin karaciğerindeki oksidatif stresi azaltır. 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, Gaziantep, Türkiye, 18 - 20 Aralık 2020.
7. İnce Akça İ, Sağlam N, **Şahin E**, Bodur A, Alver A (2018). Serum ghrelin levels of BDNF heterozygous mice were increased by high-fat diet. 1st International Food and Medicine Congress, Ankara, Turkey, 24 - 27 May 2018.
8. Bodur A, **Şahin E**, Sağlam N, İnce Akça İ, Alver A (2018). Investigation of serum neuropeptide y levels in BDNF +/- mice fed with high-fat diet. 1st International Food and Medicine Congress, Ankara, Turkey, 24 - 27 May 2018.
9. **Şahin E**, Keha EE, Us Altay D, Coşkun H (2016). Investigation of serum irisin levels of patients with metformin taking new onset type 2 diabetes mellitus. FEBS, Aydın, Türkiye, 4 - 08 Eylül 2016.

### **ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR**

1. TÜBİTAK Yayın Teşvik Ödülü-Mart 2023
2. TÜBİTAK Yayın Teşvik Ödülü-Ağustos 2022
3. KTÜ Yayın Teşvik Ödülü- Nisan 2022
4. Sözlü Bildiri 1. Ödülü  
43. Pediatri Günleri-2021
5. Poster Sunumu 2. Ödülü  
1. International Food and Medicine Congress-IFMC 2018

### **HOBİLER**

Bahçe işleri ile uğraşmak

Film izlemek

Temizlik Yapmak