



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YÜKSEK YAĞLI DİYETLE BESLENEN WİSTAR
RATLARINDA İNÜLİN DESTEĞİNİN ENDOKANABİNOİD
DÜZEYİ, KARACİĞER YAĞLANMASI VE İNSÜLİN
DİRENCİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

İsmail Mücahit ALPTEKİN

**BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Funda Pınar ÇAKIROĞLU**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK YAĞLI DİYETLE BESLENEN WİSTAR
RATLARINDA İNÜLİN DESTEĞİNİN ENDOKANABİNOİD
DÜZEYİ, KARACİĞER YAĞLANMASI VE İNSÜLİN
DİRENCİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

İsmail Mücahit ALPTEKİN

**BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Funda Pınar ÇAKIROĞLU**

**ANKARA
2022**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Wistar Ratlarında İnsülin Desteğinin Endokanabinoid Düzeyi, Karaciğer Yağlanması ve İnsülin Direnci Üzerine Etkileri” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yere alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümle ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: İsmail Mücahit ALPTEKİN

Tarih:

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim
Dalında

İsmail Mücahit ALPTEKİN tarafından hazırlanan
“Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Wistar Ratlarında İnülin Desteğinin
Endokanabinoid Düzeyi, Karaciğer Yağlanması ve İnsülin Direnci Üzerine Etkileri”
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza

Prof. Dr. Funda Pınar ÇAKIROĞLU

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Çiğdem ALTINSAAT

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza

Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU

Hacettepe Üniversitesi

Üye

İmza

Doç. Dr. Alev KESER

Ankara Üniversitesi

Üye

İmza

Doç. Dr. Özge KÜÇÜKERDÖNMEZ

Ege Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Tanımı ve Epidemiyolojisi	1
1.2. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Patogenezi	3
1.3. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Beslenme	12
1.4. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Modellemesi	14
1.5. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Obezite	15
1.6. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Endokanabinoid Sistem	17
1.7. İnsülinin Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Üzerine Etkileri	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	24
2.1. Araştırma Yeri, Zamanı, Örneklem Seçimi ve Araştırma Tasarımı	24
2.2. Ratların Temini, Bakımı ve Takibi	26
2.3. Diyet Müdahalesi	26
2.4. Ötenazi İşlemi, Numunelerin Toplanması ve Analiz Edilmesi	28
2.4.1. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı, Obezite ve İnsülin Direnci Değerlendirilmesi	29
2.4.1.1. Histopatoloji Analizleri	29
2.4.1.2. Obezite Durumu Değerlendirilmesi	30
2.4.1.3. İnsülin Direnci Değerlendirilmesi	31
2.4.2. Kan ve Doku Analizleri	31
2.4.2.1. Kan Analizleri	31
2.4.2.1.1. Tam Otomatik Biyokimya Analizatör Analizleri	32
2.4.2.1.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Analizleri	33
2.4.2.2. Doku Analizleri	33
2.4.2.2.1. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri	33
2.4.2.2.2. Kramotografik Analizler	37
2.5. Verilerin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi	39
3. BULGULAR	40
3.1. Antropometrik Ölçümler, Besin Tüketimi ve Açlık Kan Glukozu	40
3.2. Besin Tüketimi ve Enerji Alımı	42
3.3. Biyokimyasal Parametreler	43
3.4. Doku Analizleri	44
3.4.1. Ratların Organ Ağırlığı ve İndeksi	45
3.4.2. Karaciğer Dokularının Histopatolojik Sonuçları	45
	iv

3.4.3.	Dokularda qPCR Analizleri	47
3.4.4.	Dokularda LC-MS/MS Analizleri	50
3.4.5.	Elde Edilen Verilerin Korelasyon Analizleri	52
4.	TARTIşMA	55
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	70
	ÖZET	72
	SUMMARY	73
	KAYNAKLAR	74
	EKLER	95
	EK-1: Etik Kurul Onayı	96
	EK-2: TÜBİTAK Onay Formu	98
	ÖZGEÇMİř	99



ÖNSÖZ

Konusu ile literatürde ilk olma niteliği taşıyan bu tez çalışması TÜBİTAK-1002 Hızlı Destek Programı kapsamında desteklenmiştir. Doktora tezi önerisinde kurulan hipotezin araştırma sonuçları ile desteklenmiş olması mutluluk vermiştir.

Bu çalışma multidisipliner bir yaklaşım ile farklı bilim dallarından araştırmacıları bir araya getirmiştir. Doktora öğrencisi tezinin her aşamasında aktif olarak görev alarak akademik gelişimine katkı sağlamıştır. Araştırmada lisans bursiyeri olan iki öğrenci bir proje önerisinin hazırlanması ve uygulanması tecrübelerini yaşayarak akademik gelişim göstermişlerdir. Ayrıca aynı lisans bursiyerleri doktora tezi öğrencisi danışmanlığında lisans düzeyinde TÜBİTAK 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı tarafından desteklenmeye hak kazanmıştır.

Patoloji analizlerinin gerçekleştirilmesini sağlayan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Saba KİREMİTCİ'ye teşekkür ederim. Dokularda endokanabinoid düzeylerinin ölçülmesinde ve laboratuvar analizlerinde yol gösterici olan ve projeye araştırmacı olarak dahil olan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca endokanabinoid analizlerinin ölçülmesinde yardımlarından dolayı Arş. Gör. Tuba REÇBER'e teşekkür ederim. Araştırmada biyokimya ve gen analizlerinin gerçekleştirildiği laboratuvarlarda verdikleri eğitim ve desteklerinden dolayı Samet ECE'ye ve Ünal SEVİNÇ'e özel teşekkürlerimi sunarım. Deney hayvanlarının beslenme, barınma ve ameliyathane işlemlerinin gerçekleştirildiği Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı personeline yardımları için teşekkür ederim. Projeye lisans bursiyeri şeklinde dahil olarak hem keyifli zaman geçiren hem de protokole uygun şekilde destek veren İrem AYDOĞAN'a ve Nagihan YILMAZ'a katkılarından dolayı teşekkür ederim. Özellikle, çalışmam esnasında tüm hazırlıklarda yanımda olan

kardeşlerim Şeyma ALPTEKİN ve Esmâ ALPTEKİN'e, kuzenim Enes ÇALIŞKAN'a, mesai arkadaşım Arş. Gör. Emre DUMN'a emekleri, yardımları ve destekleri için çok teşekkür ederim.

Akademik hayatım boyunca bana yol gösteren, tez dönemim boyunca yardımlarını eksik etmeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Funda Pınar ÇAKIROĞLU'na göstermiş olduğu ilgi, sevgi, anlayış ve üzerimdeki emeklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım. Akademisyenliği bir meslekten ziyade bir yaşam tarzı olarak benimsememi sağlayan ve doktor ünvanı aldığım aynı günde profesörlük ünvanı alan değerli hocam Prof. Dr. Alev KESER'e teşekkür ederim. Eğitim hayatıma dokunan Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi hocalarıma emekleri için teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca insanlara karşılıksız faydalı işler yapmayı öğrendiğim, dedem Kazım ALPTEKİN'e, babam Metin ALPTEKİN'e, annem Zahire ALPTEKİN'e, rahmetli babaannem Hava ALPTEKİN'e ve akademik anlamda destekçim dayım Prof. Dr. İsmail ÇALIŞKAN'a sevgi ve saygılarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

2-AG	2-Araşidonoilgliserol
<i>Adcy1</i>	Adenilat siklaz
<i>Adrb3</i>	Beta-3-adrenerjik reseptör
AEA	Anandamid
ALT	Alanin aminotransferaz
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
AST	Aspartat aminotransferaz
AUC	Eğri altında kalan alan
CHO	Karbonhidrat
<i>Cnr1</i>	Kannabinoid reseptör 1
<i>Cnr2</i>	Kannabinoid reseptör 2
CT	Threshold Cycle (eşik değer döngüsü)
DNL	De novo lipogenez
EKS	Endokannabinoid sistem
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FFA	Serbest yağ asidi
<i>Gnas</i>	Guanine Nükleotid bağlayıcı protein
GPCR	G protein-coupled reseptör
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
K	Kontrol
KEGG	Genler ve Genomların Kyoto Ansiklopedisi
Kİ	Kontrol + İnülin

LC-MS/MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LPL	Lipoprotein lipaz
NAFL	Nonalkolik yağlı karaciğer
NAFLD	Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı
NASH	Nonalkolik steatohepatit
PFC	Prefrontal korteks
PGC-1α	Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama koaktivatör 1-alfa
PKA	Protein kinaz A
<i>Pnpla3</i>	Patatin benzeri fosfolipaz alanı içeren protein 3
PPARγ	Peroksizom-proliferatör aktivatör reseptör gama
qPCR	Kantitatif gerçek zamanlı PCR
<i>Srebp-1c</i>	Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein-1c
TG	Trigliserit
TK	Toplam kolesterol
μL	Mikrolitre
<i>Trpv1</i>	Transient reseptör potansiyel vanilloid 1
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein
YY	Yüksek yağlı
YYİ	Yüksek yağlı + İnülin

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Dünya genelinde NAFLD prevalans dağılımı	2
Şekil 1.2. Yağlı karaciğer hastalığının temel süreçleri	3
Şekil 1.3. Diyetle alınan karbonhidrat ve yağların karaciğer ve yağ dokusu yolakları	5
Şekil 1.4. Moleküler veri tabanı Genler ve Genomların Kyoto Ansiklopedisi (KEGG)	6
Şekil 1.5. <i>Adrb3</i> lokalizasyonunun grafiksel özeti	8
Şekil 1.6. Karaciğerde artmış intraselüler cAMP ve PKA aktivasyonunun karbonhidrat ve lipid metabolizması üzerindeki etkileri	9
Şekil 1.7. NAFLD'deki cAMP/PKA/EPAC medyatörlerinin ve hedeflerinin şematik diyagramı	10
Şekil 1.8. Hepatositlerde <i>Pnpla</i> I148M'nin (rs738409) moleküler mekanizması	11
Şekil 2.1. Araştırma akış şeması	25
Şekil 3.1. Ratların 12 hafta boyunca haftalık ortalama ağırlık değişimleri	42
Şekil 3.2. 12 haftalık vücut ağırlığı AUC değerleri	42
Şekil 3.3. İnülin ilavesinin non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı gelişimi üzerine etkileri	47
Şekil 3.4. Prefrontal korteks dokularında genlerin ekspresyon düzeyleri	49
Şekil 3.5. Karaciğer dokularında genlerin ekspresyon düzeyleri	50
Şekil 3.6. Prefrontal korteks ve karaciğerde LC-MS/MS analizi ile ölçülen Anandamid ve 2-Araşidonilgliserol düzeyleri	51

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	NAFLD steatoz derecelendirme sistemi	1
Çizelge 2.1.	Araştırma için hazırlanan diyetlerin enerji ve makro besin ögesi örüntüleri	27
Çizelge 2.2.	Araştırmada kullanılan yemlerin içerikleri	28
Çizelge 2.3.	Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı aktivite skoru değerlendirilmesi	30
Çizelge 2.4.	Gerçek zamanlı qPCR analizleri için belirlenen gen primerlerinin baz dizilimleri	34
Çizelge 3.1.	Ratların araştırmanın başlangıcı ve 12. haftasındaki antropometrik ölçümleri ile açlık kan glukoz değerleri	41
Çizelge 3.2.	Ratların araştırma süresince günlük besin tüketimi ve enerji alımı miktarları	43
Çizelge 3.3.	Ratların biyokimyasal sonuçları	44
Çizelge 3.4.	Karaciğer ve beyin organlarının ağırlığı ve indeksi	45
Çizelge 3.5.	Karaciğer dokularının histopatolojik özellikleri ve grupların histopatolojik skorları	46
Çizelge 3.6.	Dokularda gen ekspresyon düzeyleri	49
Çizelge 3.7.	Dokulardaki LC-MS/MS analizleri ile ölçülen Anandamid ve 2-Araşidonilgliserol düzeyleri	51
Çizelge 3.8.	Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı ile antropometrik ölçümler, gen ekspresyon düzeyleri, kan açlık hormonları ve kan adipokinleri arasındaki korelasyon	53

Çizelge 3.9. Endokanabinoid düzeyleri ile antropometrik ölçümler, gen ekspresyon düzeyleri, kan açlık hormonları ve adipokinler arasındaki korelasyon

54



1. GİRİŞ

1.1. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Tanımı ve Epidemiyolojisi

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), karaciğer hepatositlerinde trigliseritlerin birikmesi (steatoz) olarak tanımlanmaktadır ve nonalkolik yağlı karaciğer (NAFL) ve nonalkolik steatohepatit (NASH) oluşumu ile karakterize endokrin bir hastalıktır (Loomba ve ark., 2012; Fakhoury-Sayegh ve ark., 2015).

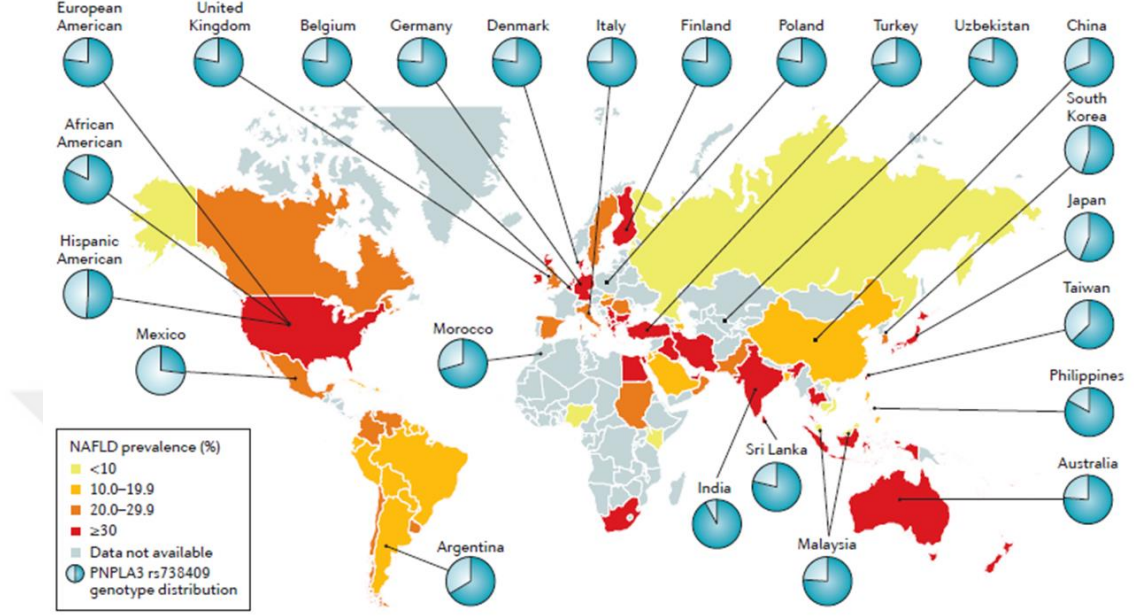
Steatoz, yağ damlacıkları içeren hepatositlerin miktarından hesaplanmaktadır (Paschos ve Paletas, 2009). NAFLD, makroveziküler, mikroveziküler veya ikisi karışık olarak hepatositlerin %5'ini aşan karaciğer steatozunun varlığı ile tanımlanmaktadır (Vernon ve ark., 2011). Steatoz, merkezi çekirdek etrafında çok sayıda küçük sitoplazmik lipid damlacıkları ile karakterize olan mikroveziküler düzeyde veya nükleusu periferde kaydıran büyük lipid damlacığı içeren yağlı hepatositler ile karakterize olan makroveziküler düzeyde oluşabilir (Amacher, 2011). Her iki düzey için de eşik değeri %5 olarak kabul edilmektedir ve yağlanma yüzdesine göre derecelendirilmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. NAFLD steatoz derecelendirme sistemi (Liang ve ark., 2014)

		Skor			
		0	1 (+)	2 (++)	3 (+++)
Steatoz	Makroveziküler	<%5	%5-33	%33-66	>%66
	Mikroveziküler	<%5	%5-33	%33-66	>%66
	Hipertrofi	<%5	%5-33	%33-66	>%66

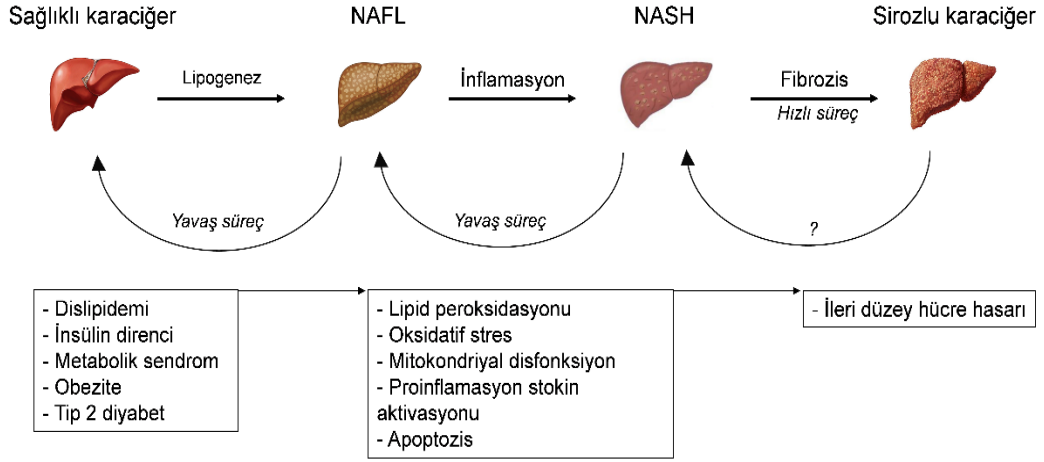
Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, birçok batı ülkesinde artan obezite ve diyabet insidansı ile ilişkilidir (Van Herck ve ark., 2017). NAFLD prevalansının dünya popülasyonunun yaklaşık %25'i olduğu tahmin edilmektedir (Araújo ve ark., 2018).

Ülkemizde ve birçok batı ülkesinde NAFLD prevalansının %30'dan daha fazla olduğu belirtilmektedir (Şekil 1.1) (Younossi ve ark., 2018).



Şekil 1.1. Dünya genelinde NAFLD prevalans dağılımı (Younossi ve ark., 2018)

Yağlı karaciğer hastalığının prevalansı dünyanın hemen hemen her bölgesinde yüksek enerjili diyet ve sedanter yaşam tarzına bağlı olarak gelişen obezitenin başlamasıyla birlikte artmaya devam etmektedir (Haas ve ark., 2016). Metabolik sendromun bileşenleri arasında yer alan abdominal obezite, artmış serum trigliserit (TG) düzeyi ve bozulmuş açlık glikozu NAFLD'nin gelişimi için en güçlü bağımsız risk faktörleri arasında gösterilmektedir (Luyckx ve ark., 2000). NAFLD'nin karmaşık patogenezi, obezite, Tip 2 diyabet ve insülin direnci gibi bozukluklarla yakından ilişkilidir ve hepatik steatoz, fibrozis ve siroza doğru devam etmektedir (Brunt ve ark., 2019) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Yağlı karaciğer hastalığının temel süreçleri. NAFL; Nonalkolik yağlı karaciğer, NASH; Nonalkolik steatohepatit (Brunt ve ark. 2019'dan uyarlanmıştır).

1.2. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Patogenezi

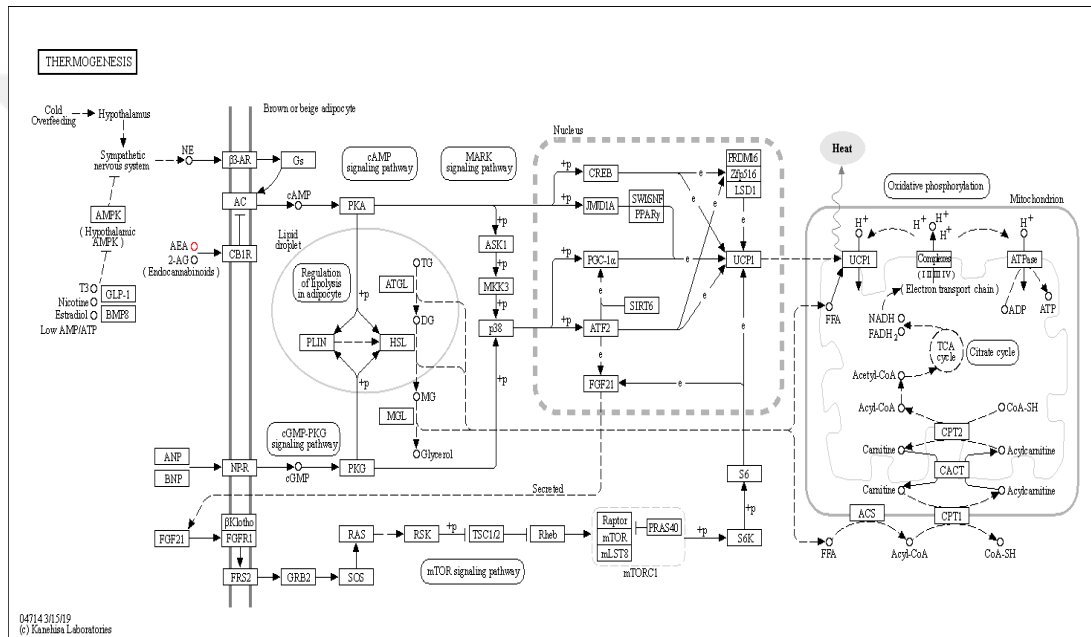
İnsülin direnci NAFLD'nin başlamasında en etkili faktör olarak değerlendirilmektedir. Obez ve diyabetik bireylerin %70-80'inde NAFLD gelişimi olduğu için, NAFLD'nin insülin direnci ile yakından ilişkili olduğunu gösteren birçok araştırma bulunmaktadır (Williams ve ark., 2011; Loomba ve ark., 2012). Lipogenez ve yağ asidi sentezi ile indüklenerek düzeyleri fazla miktarda artan yağ asitleri ve okside ürünleri adipoz doku ve karaciğer gibi periferik dokularda birikerek insülin direncine neden olmaktadır (Loomba ve ark., 2021). Bu durum NAFLD'de karaciğer hücrelerinin %5 ve daha fazla miktarda yağın karaciğerde birikmesi ile karakterizedir (Lang ve ark., 2020). İnsülin direnci ile başlayan NAFLD süreci, hastalığın erken evresinde tedavi edilmezse hepatik steatoz ve siroz yönünde hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Adipoz dokudan salınan sitokinler arasında yer alan adiponektin bu sürecin tanı ve tedavisinde önemli faktörlerden birisidir. Çünkü adiponektin yağ asidi oksidasyonunu düzenleyen ve hem yağ dokusunda hem de karaciğerde lipid birikimini önleyen spesifik bir adipokindir (Angulo, 2006). Ayrıca hepatik insülin duyarlılığı ve vücut glukoz homeostazı üzerinde olumlu etkilere sahiptir (Berg ve ark., 2001). Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı gelişiminde görülen hipoadiponektinemi yağ asidi metabolizmasını bozmakta ve karaciğerde kronik inflamatuvar durumunu

arttırmaktadır (Bugianesi ve ark., 2005). Bu nedenle, adiponektin düzeylerinin normal aralıklarda olması, NAFLD hastalarında inflamasyon ve fibrozis gelişmesini önleyebilmektedir. Kısacası adiponektin düzeyleri, NAFL ile NASH ve/veya sirozlu karaciğer arasındaki temel farklılıklardan biridir.

Adipoz doku başta olmak üzere vücutta lipogenezi artırarak trigliserit depolanmasına neden olan etmenlerin başında yüksek yağlı diyetler gelmektedir. Büyümeyi sağlayan ve obezite ve diyabet gelişimi üzerinde etkili olan enerji harcaması ve makro besin öğelerinin metabolizmasının temel organları arasında gastrointestinal sistem, kas, karaciğer, adipoz doku ve endokrin sistem yer almaktadır (Watkins ve Kim, 2015). Obezite ve insülin direnci gelişimi ile birlikte adipoz dokuda artan lipoliz NAFLD'de TG birikiminin önemli bir nedenidir (Donnelly ve ark., 2005; Jha ve ark., 2014). Trigliserit sentezi için substrat sağlamanın yanı sıra adipoz doku tarafından salgılanan leptin ve adiponektin gibi endokrin faktörler NAFLD patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (Jiménez-Cortegana ve ark., 2021).

Sağlıklı bir birey diyetsel yağ tükettiğinde, lipidler bağırsakta trigliserit haline dönüştürülerek periferik dokulara (özellikle kas ve adipoz dokusuna) iletilmek üzere şilomikronlar olarak paketlenmektedir (Duwaerts ve Maher, 2019). Adipoz dokudan salınan yağ asitleri kas dokularına glukoz alımını azaltarak metabolitlerin karaciğer dokularına gitmesine neden olurlar ve gelişen insülin direnci de novo lipogenezi arttırmaktadır (Alam ve ark., 2016) (Şekil 1.3).

Tüm bu faktörlerle birlikte; NAFLD gelişiminde, denovo lipogenezdeki artışla birlikte lipid metabolizmasdaki düzensizlik ve bozulmuş yağ asidi oksidasyonu hepatositlerdeki lipid birikiminin ana nedenleridir (Greuter ve ark., 2017). Son yıllarda, steatozun genetik belirleyicileri, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları kullanılarak ortaya çıkarılmaktadır (Dongiovanni ve ark., 2015). Endokanabinoidlerin (Anandamid, 2-Araşidonilgliserol) yer aldığı NAFLD gelişimindeki lipid damlacıkları oluşumunun/artışının genetik yolları moleküler veri tabanı Genler ve Genomların Kyoto Ansiklopedisi (KEGG)'den elde edilerek Şekil 1.4'te gösterilmiştir.



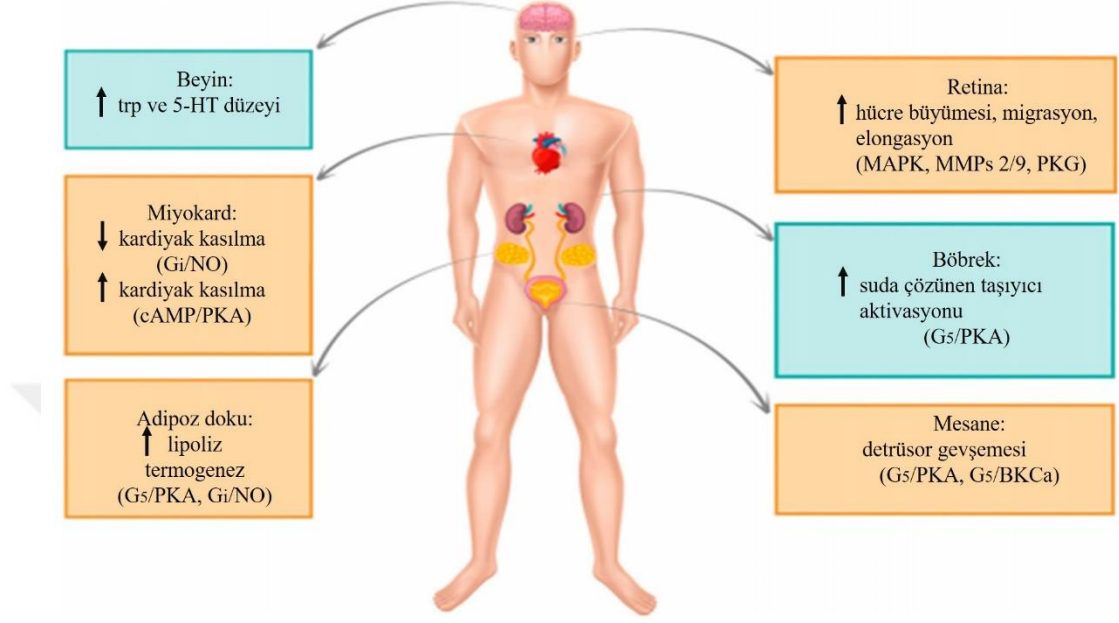
Şekil 1.4. Moleküler veri tabanı Genler ve Genomların Kyoto Ansiklopedisi (KEGG)

Endokanabinoid sistemin NAFLD patogenezi üzerindeki etkilerine aracılık edebilecek önemli genlerden bazıları Beta-3-adrenerjik reseptör (*Adrb3*) (Sakamoto ve ark., 2019), Adenilat siklaz 1 (*Adcy1*) (Wahlang ve ark., 2018), Guanine nükleotid bağlayıcı protein (*Gnas*) (Hoang ve ark., 2019), Kanabinoid reseptör 1 (*Cnr1*) (Irungbam ve ark., 2020) ve Kanabinoid reseptör 2 (*Cnr2*)'dir (Rossi ve ark., 2012). Ayrıca Patatin benzeri fosfolipaz alanı içeren protein 3 (Adiponutrin, *Pnpla3*) ve Transient reseptör potansiyel vanilloid 1 (*Trpv1*) genleri de NAFLD gelişiminde önemli faktörlerdir (Li ve ark., 2012; Bruschi ve ark., 2017).

Endokannabinoid sistem, nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) gibi çeşitli metabolik hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır (Auguet ve ark., 2014; Charytoniuk ve ark., 2022). Endokannabinoidlerin, G proteinine bağlı kanabinoid reseptörleri (*Cnr1* ve *Cnr2*) aktive ederek merkezi ve periferik lipid metabolizmasına büyük ölçüde dahil olduğu bildirilmiştir (Caraceni ve ark., 2009). Endokannabinoidler, iştahı stimüle ederek enerji alımını arttırırlar, aynı zamanda adipoz doku, karaciğer ve iskelet kası gibi periferik dokularda lipogenezi arttırarak obezite ve NAFLD gelişimine neden olurlar (Liu ve ark., 2016). *Cnr1* reseptörlerinin NAFLD gelişiminde rol oynadığı ve *Cnr1* antagonistlerinin obezite ile ilişkili hepatik steatozu ve inflamatuvar yanıtı azalttığı bildirilmiştir (Gary-Bobo ve ark., 2007). *Cnr2* reseptörleri için hepatoprotektif özellikler, karaciğer hasarı oluşturulan deneysel modellerde gösterilmiştir (Rossi ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda, *Cnr2* stimülasyonunun TNF- α ve IL-6 gibi inflamatuvar düzeylerini azalttığı IL-10 gibi antiinflamatuvar düzeylerini arttırdığı belirlenmiştir (Wang ve ark., 1994; Cencioni ve ark., 2010; Correa ve ark., 2010).

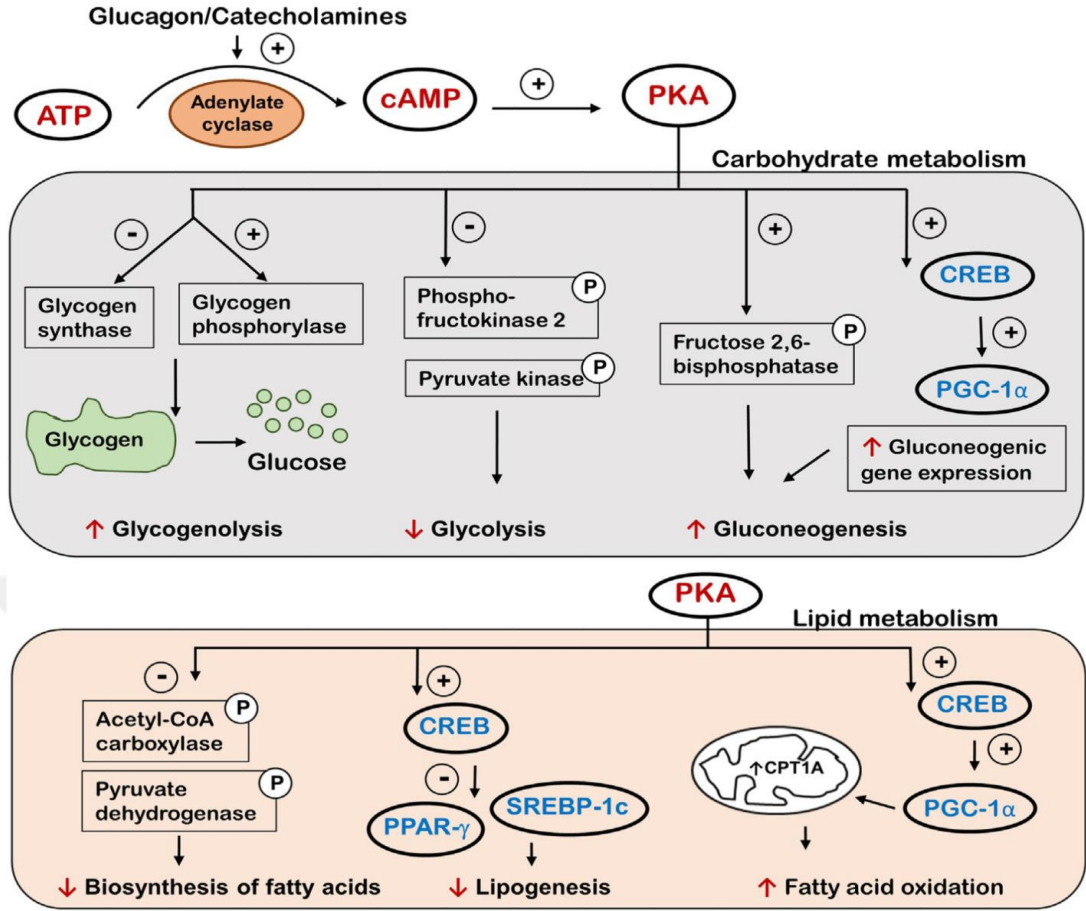
Beta-3-adrenerjik reseptör (*Adrb3*) polimorfizmlerinin, NAFLD riski üzerindeki etkisi belirsizliğini korusa da visceral obezite ve insülin direncinin gelişmesinde anahtar rol oynadığı belirtilmektedir (Sakamoto ve ark., 2019). *Adrb3* esas olarak visceral yağ dokularında eksprese edilmektedir ve kahverengi adipositlerde termojenezin ve beyaz yağ dokularında lipolizin arttırılmasında önemli rol oynamaktadır (Şekil 1.5) (Nahmias ve ark., 1991; Krief ve ark., 1993; Schena ve Caplan, 2019). *Adrb3*, G proteinlerinin etkisiyle adenilat siklazın katekolamin kaynaklı aktivasyonuna aracılık etmektedir ve enerji harcaması ve vücut yağ dağılımındaki varyasyonlara katkıda bulunmaktadır (Mund ve ark., 2013; Collins ve ark., 2014). Bugüne kadar, *Adrb3* geninde bazı polimorfizmler tanımlanmıştır. Bu polimorfizmler arasında, obezitenin gelişimi üzerindeki genetik etkiye yönelik *Adrb3* rs4994 polimorfizmini (T190C, *Trp64Arg*) inceleyen, obezite ve insülin direnci ile ilişkilendiren birçok çalışma bulunmaktadır (Widén ve ark., 1995; Yoshida ve ark., 1995; Kurokawa ve ark., 2001). Rs4994 C aleli ile ilişkili metabolik anormalliklerin varlığı NAFLD ile ilişkilendirilmektedir (Tilg ve ark., 2017; Finck, 2018). Normal ağırlıktaki bireyler ile yapılan bir çalışmada, bu polimorfizmin (Rs4994 C) Alanin

aminotransferaz (ALT) düzeyindeki artış ile de ilişkili olduğu bulunmuştur (Murata ve ark., 2003).

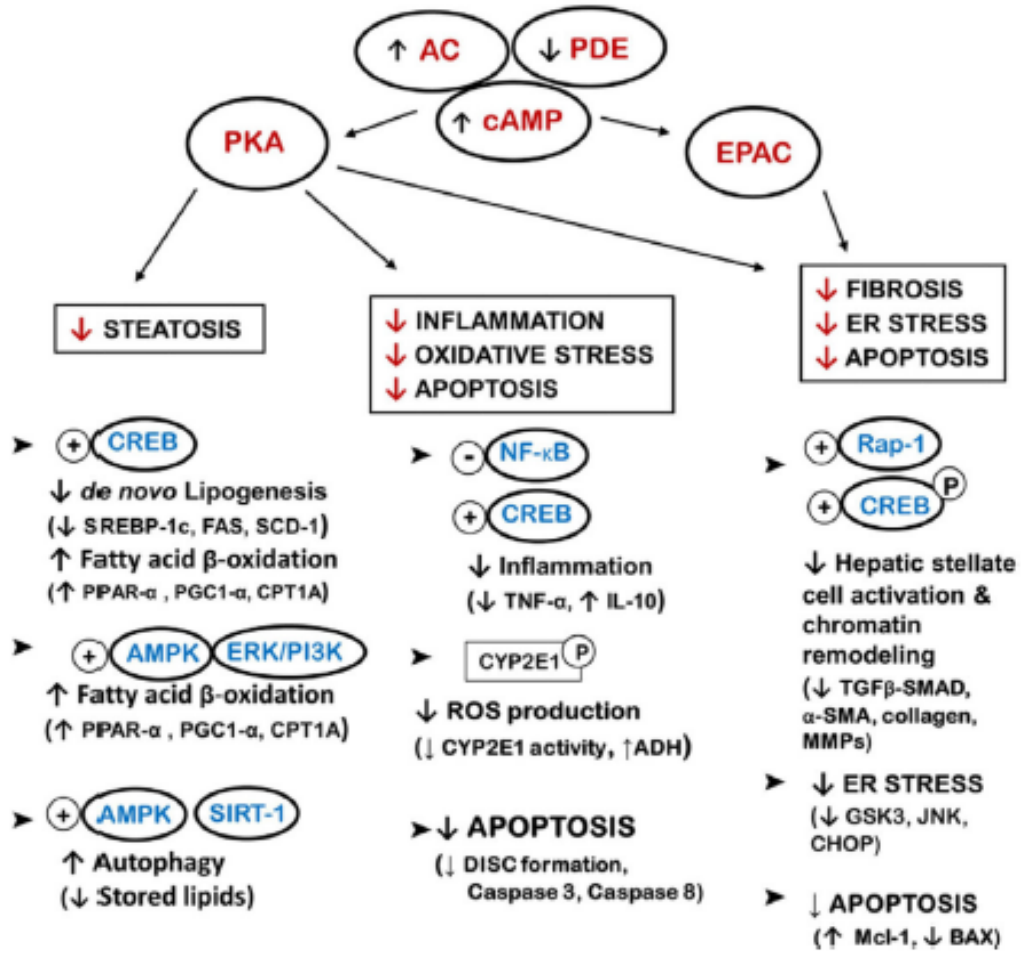


Şekil 1.5. *Adrb3* lokalizasyonunun grafiksel özeti. İnsan doku/hücre dizilerinde incelenen ve rapor edilen yollar sarı kutularda gösterilmektedir. Deney hayvanlarında çalışılan ancak insanlarda henüz gösterilmeyen yollar mavi kutularda gösterilmektedir. *Alternatif cAMP'den bağımsız yol. Trp, triptofan; 5-HT, 5-hidroksitriptamin; MAPK, mitojenle aktive olan protein kinaz; MMPs, metaloproteinazlar, PKG, protein kinaz G; NO, nitrik oksit; PKA, protein kinaz A (Schena ve Caplan., 2019).

Adenilat siklazlar (Ac'ler) ATP'den 3'-5' siklik adenosin monofosfatın (cAMP) sentezini katalize eden enzimlerdir. Siklik adenosin monofosfat, önemli bir ikinci habercidir, protein kinaz A'nın (PKA) aşağı yönlü aktivitesine aracılık etmektedir ve pankreas adacıklarının beta hücrelerinden insülin salınımını düzenlemektedir (Liang ve ark., 2016). Bugüne kadar mevcut olan kanıtlar, cAMP'nin NAFLD ve NASH'daki steatoz ve obezitedeki azalmada pozitif bir aracı olarak rolünü desteklemektedir (Şekil 1.6, Şekil 1.7) (Wahlang ve ark., 2018). Yapılan bir çalışmada, hücre içi cAMP seviyelerinin sürekli yükselmesinin ve sonuç olarak sinyal yollarındaki düzensizliğin yüksek yağlı diyetle oluşan NAFLD'nin indüksiyonunda önemli bir rol oynadığı sonucuna ulaşılmıştır (Awaad ve ark., 2020).



Şekil 1.6. Karaciğerde artmış intraselüler cAMP ve PKA aktivasyonunun karbonhidrat ve lipid metabolizması üzerindeki etkileri. PKA aktivasyonu, karaciğerde artan glikoz üretimi ve azalan lipid birikiminin net etkisi ile aktivasyona (+) veya inaktivasyona (-) yol açan farklı efektör moleküllerin fosforilasyonuna neden olur. ATP, adenosin trifosfat; cAMP, siklik adenosin monofosfat; PKA, protein kinaz A; CREB, cAMP yanıt elemanı bağlayıcı proteini; PGC-1α, peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama koaktivatör 1-alfa; PPARγ, peroksizom-proliferatör aktivatör reseptör gama; *Srebp-1c*, sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein-1c. (Wahlang ve ark., 2018).

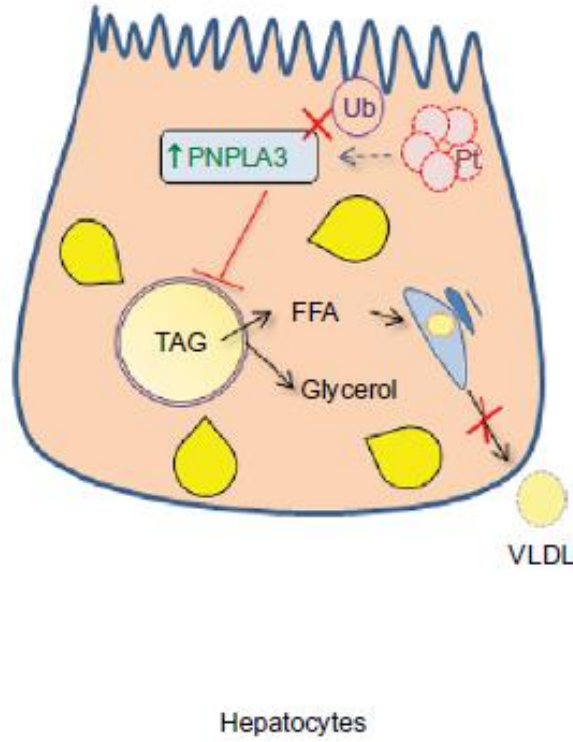


Şekil 1.7. NAFLD'deki cAMP/PKA/EPAC medyatörlerinin ve hedeflerinin şematik diyagramı. Bu şekil ayrıca cAMP/PKA/EPAC aktivasyonu ile modüle edilen yolları ve karaciğerdeki lipid metabolizması, inflamasyon, oksidatif ve endoplazmik retikulum (ER) stresi, apoptoz ve fibrojeniz gibi genel etkileri göstermektedir. (Wahlang ve ark., 2018).

Guanine nükleotid bağlayıcı proteinler (*Gnas*) hücrelerde proliferasyon, farklılaşma, protein sentezi ve protein taşınması gibi biyolojik fonksiyonlarda rol oynamaktadırlar. Hepatoselüler karsinomdaki kötü prognoz, *Gnas* türlerinden olan *Gnas3*'ün bastırılmış ekspresyonu ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2015). Hücrel aktivite ve karaciğer kanserindeki çoklu fonksiyonları nedeniyle, *Gnas3*'ün lipid metabolizmasında da rol oynayabileceği ve NAFLD patogenezi etkileyebileceği hipotezine dayanan bir çalışmanın sonucunda; *Gnas3*'ün, asetil ko-A karboksilaz ve açıl koenzim A oksidaz transkripsiyonlarının regülasyonu yoluyla de

novo lipogenezi ve yağ asidi esterifikasyonunu etkileyerek NAFLD gelişimine dahil olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Zhu ve ark., 2020).

Patatin benzeri fosfolipaz alan içeren protein 3 (adiponutrin, *Pnpla3*), *Pnpla* ailesi olarak bilinen lipid metabolize edici bir enzim grubuna aittir (Pingitore ve Romeo, 2006; Kienesberger ve ark., 2009; He ve ark., 2010). İkibinbir yılında tanımlanan *Pnpla3* membranlar ve lipid damlacıkları ile sıkı bir şekilde ilişkilidir (Şekil 1.8) (Bruschi ve ark., 2017). *Pnpla3* geninin genetik bir varyantı (rs738409 C>G) ile NAFLD gelişimi arasındaki ilişki ilk olarak Romeo ve ark. (2008) tarafından ortaya konmuştur (Romeo ve ark., 2008). Daha sonraki yıllarda bu ilişkiyi ortaya koyan ve benzer sonuçlar bulunan birçok araştırma yapılmıştır (Valenti ve ark., 2010; Sookoian ve ark., 2011; Moon ve ark., 2022).



Şekil 1.8. Hepatositlerde *Pnpla3* I148M'nin (rs738409) moleküler mekanizması (Bruschi ve ark., 2017). Ub, ubiquitin; TAG, triaçilgliserol; VLDL, çok düşük dansiteli lipoprotein; FFA, serbest yağ asitleri; *Pnpla3*, patatin benzeri fosfolipaz alan içeren gen 3.

Transient reseptör potansiyel vanilloid 1 (*Trpv1*) çok sayıda endojen fiziksel ve kimyasal uyararı algılayabilen ve zararlı ısıyı ve ağrı uyarılarını aktarabilen bir yapıdır (Nilius, 2007; Nilius ve ark., 2007; Nilius ve Appendino, 2011; Zhong ve ark., 2011). Bu yapı karaciğer hücrelerinde de bulunmaktadır ve yukarı yönlü regülasyonu hepatosellüler karsinomlu hastalarda daha iyi bir prognoz gösterdiği düşünülmektedir (Miao ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada kapsaisin ile *Trpv1* aktivasyonunun, deney hayvanlarında karaciğerde lipid birikimini ve trigliserit seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir (Li ve ark., 2012).

1.3. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Beslenme

İnsülin direnci ve inflamatuvar sitokinler iki farklı evrenin gelişimine neden olan temel iki faktör olarak değerlendirilse de NAFLD’de son zamanlarda “multiple modeli” fikri benimsenmiştir. Bu modele göre, beslenme alışkanlıkları, insülin direnci, visseral adipozite, inflamatuvar durum, oksidatif stres, mikrobiyomal değişiklik ve genetik yatkınlık NAFLD gelişimi ve ilerlemesi için kabul edilen risk faktörleri olarak kabul edilmektedir (Buzzetti ve ark., 2016). Özellikle diyetin makro besin ögesi örüntüsü, diğer çevresel faktörler ve genetik yatkınlık faktörleri insülin direnci, visseral obezite ve bağırsak mikrobiyom değişikliklerinin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Jardon ve ark., 2022).

Vücut ağırlığının azaltılması ve düzenli fiziksel aktivitenin arttırılmasına yönelik yaşam tarzı değişiklikleri NAFLD yönetiminin hala temelini oluşturmaktadır. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının yönetimi için “Avrupa Karaciğer Çalışmaları Derneği”, “Avrupa Obezite Çalışmaları Derneği” ve “Avrupa Diyabet Araştırmaları Birliği” tarafından oluşturulan Klinik Uygulama Kılavuzlarında NAFLD’li fazla kilolu/obez hastalarda %7-10 vücut ağırlığı kaybı hedefi önerilmektedir (Toshimitsu ve ark., 2007; European Association for the Study of the Liver, 2016). Bu bağlamda, zeytinyağı, kuru baklagiller, kepekli tahıllar, meyveler, sebzeler ve balık ürünlerinin yüksek miktarda tüketimi; süt ürünleri ve et ürünlerinin düşük miktarda tüketimi ve ılımlı alkol tüketimi ile karakterize olan Akdeniz diyetinin NAFLD’nin önlenmesi ve

tedavisinde yeterli terapötik bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir (Ramírez-Vélez ve ark., 2018). Çünkü diyet ile NAFLD arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır. Aşırı enerji alımı obeziteye yol açmakta ve bu da NAFLD riskini arttırmaktadır (Almeda-Valdes ve ark., 2014). Doymuş yağ bakımından zengin ve antioksidan özellikli C ve E vitaminleri bakımından sınırlı beslenme tarzının NASH ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (Musso ve ark., 2003). Özellikle doymuş yağ içeriği yüksek olan diyetlerin insülin direnci ve hepatik inflamasyon ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Zelber-Sagi ve ark., 2007). Benzer şekilde, diyet karbonhidrat örüntüsü de NAFLD gelişimi için etkili bir faktör olarak değerlendirilmektedir. Rafine karbonhidrat ve doymuş yağların fazla tüketimi, artan fruktoz ve diğer basit şekerlerin tüketimi, yüksek enerjili batı tarzı beslenme alışkanlıklarının artarak devam etmesi, son kırk yılda tipik olan zararlı beslenme alışkanlıkları fazla kiloluluk/obezite ve insülin direncindeki dramatik artışlar ile ilişkilendirildiği gibi son zamanlarda da NAFLD ile ilişkilendirilmektedir (Haas ve ark., 2016).

Diyetle alınan makro besin ögeleri ile NAFLD arasındaki ilişkiye yönelik yapılan araştırmalarda hayvan modelleri oldukça önemlidir. Geliştirilen hayvan modelleri NAFLD'nin patofizyolojik mekanizmalarının açıklanmasında hayati bir rol oynamıştır ve bunu yapmaya devam etmektedir (Van Herck ve ark., 2017). Son gelişmelere rağmen, NAFLD için geliştirilen hayvan modelleri insanlardaki hastalığının temel özelliklerinin tamamını hala yansıtamamaktadır. Artan obezite ve/veya insülin direnci göz önünde bulundurularak NAFLD için henüz altın standart bir modelin geliştirilemediği belirtilmektedir (Haas ve ark., 2016). Günümüzde hiçbir diyet modeli kemirgenlerdeki tüm NAFLD spektrumunu kapsamamaktadır. Ancak ratlar üzerinde yapılan araştırmalar ve geliştirilen protokol ve modeller literatüre önemli katkı sağlamaktadır. Yüksek yağlı (YY) diyetin hayvanların türü ve cinsiyetine bağlı olarak farklı derecelerde insülin direnci ve NAFLD'yi indüklediği belirtilmektedir (Hashimoto ve Tokushige, 2011; Ganz ve ark., 2014).

1.4. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Modellemesi

Nonalkolik yağlı karaciğer geliştirme modellerinde birçok hayvan türü kullanılmaktadır. Ancak obezite, Tip 2 diyabet ve NAFLD geliştirmek için gerçek bir predileksiyon nedeniyle genellikle farelerden C57BL/6 türü ve ratlardan Wistar ve Sprague Dawley türleri tercih edilmektedir (Takahashi ve ark., 2012). Geliştirilecek modellerde hayvan türü kadar uygulanan protokoller de önemlidir. NAFLD geliştirmek için diyet, genetik ve kimyasal modeller gibi türler bulunmaktadır ve bu modellerin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Yağlı karaciğer hastalığı geliştirme modelleri steatoz ve diğer değişiklikleri gerçekleştiren mekanizmaya göre sınıflandırılabilir. İlk grup karaciğerde lipid salınımı veya sentezini arttıran modelleri içerirken (yüksek yağlı diyet, yüksek fruktoz/sükroz içeren diyet, kombine diyetler), ikinci grup lipid salınımını veya katabolizmasını azaltan modelleri içermektedir (metiyonin ve kolinden sınırlı diyet, kolinden sınırlı diyet, L-amino asit içeren diyet) (Kucera ve Cervinkova, 2014). Belirgin genetik hasar sınırlı sayıda NAFLD hastasında olduğu için, hayvanlarda NAFLD'nin diyet modellerinin kullanımı genetik modellerden daha fazla insan hastalığı ile ilişkilendirilmektedir (Fellmann ve ark., 2013). Ratlarda en yaygın kullanılan model yüksek yağlı diyetlerdir. Yüksek yağlı diyet modelleri ile ilgili olarak, yağ içeriğinde, yağ türünde ve olası kullanılacak supplementlerde geniş bir çeşitlilik olması karmaşık bir seçime neden olmamaktadır. Yüksek yağlı diyetle indüklenen modellerin temel avantajı hem patofizyolojik hem de fenotipik olarak insanlardaki NAFLD'ye olan benzerliktir. Temel dezavantaj olan uzun deney süresi ve düşük NAFLD şiddeti olsa da bu durumlar dikkate alınması gereken mono-disakkaritler, trans yağlar ve kolesterol kullanılarak diyetin çeşitlendirilmesiyle çözülebilmektedir (Van Herck ve ark., 2017). Yapılan bir çalışmada, yüksek yağlı diyet ile (25g/kg/gün) 12 hafta beslenen ratlarda yağlı karaciğer gelişimi sağlanamamış ve içme sularına %30'luk sükroz ekleme diyetel modifikasyonu ile 8 hafta sonra bu gelişim sağlanmıştır (Kismet ve ark., 2017). Ancak burada yüksek yağlı diyet tanımının detaylandırılması oldukça önemlidir. Standart rat diyetleri insanlar için önerilen diyet yağından daha az miktarda yağ içermektedir. İnsanlarda toplam enerji alımının yaklaşık %30'unun yağ kaynaklı olmasının aksine, standart rat diyetleri enerjinin %10'undan daha az yağ içermektedir. Ratlarda yüksek

yağlı diyet modellerinde ise bu oran %30-50 ve %50'den daha fazla olabilmektedir (Fellmann ve ark., 2013). Yüksek yağlı diyet modellerinin içerikleri kolesterol içermesi ve diyetle ve/veya içme suyuna eklenen şekerin türü açısından önemli ölçüde değişebilmektedir (Denk ve ark., 2019). Yüksek yağlı diyetlerde belirli miktarda sükröz eklenmesinin glikoz intoleransı, insülin direnci ve karaciğer steatozu gelişimi açısından etkili olduğu belirtilmektedir (Jensen ve ark., 2018; Jahn ve ark., 2019).

Yağlı karaciğer gelişimini deneysel modellerde oluşturma yöntemleri bulunmakla birlikte NAFLD tanısı konulması da önemlidir. Biyokimyasal belirteçler, radyolojik görüntüleme ve seçilmiş vakalarda karaciğer biyopsisi tanı ve prognozda yardımcı olmaktadır. Bu yöntemlerden karaciğer biyopsisi NAFLD'nin tanısal değerlendirmesi için altın standart olmaya devam etmektedir (Pappachan ve ark., 2017; Bedossa, 2018; Berger ve ark., 2019). Genel olarak obezite ve insülin direnci gelişimi ile karakterize olan NAFLD için; artmış serum aminotransferaz düzeyleri ve/veya hepatomegali durumunun gelişmesi, sonrasında ultrason, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme gibi yöntemlerle görüntüleme sonucunda yağlı karaciğer gelişiminin gözlenmesi, son olarak NAFLD evresinin belirlenmesi ve ilerleme riskinin ortaya konulması için biyopsi uygulaması önerilmektedir. Deney hayvanı çalışmalarında patolojik analizler NAFLD tanısı konulmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Koch ve Yeh, 2018).

1.5. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Obezite

Yüksek obezite prevalansı dünya genelinde en önemli sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Obezite prevalansındaki artış birçok metabolik bozuklukla yakından ilişkilidir. Obezite hastalığı ve fazla kilolu olmak diyabet (Hu ve ark., 2014), nonalkolik yağlı karaciğer (Cuzmar ve ark., 2020), metabolik sendrom (Rizzo ve ark., 2013) ve dislipidemi (Su ve Peng, 2020) için risk faktörüdür. Bu ilişkiler özellikle doymuş yağ asidi oranı fazla olan yüksek yağlı diyetlerden kaynaklanmaktadır. Fazla kilolu veya obez olmanın aşırı yüksek enerji alımı, düşük diyet lifi alımı, yüksek yağlı

diyetler ve düşük fiziksel aktivite düzeyi ile nitelendirilen modern yaşam tarzının kaçınılmaz bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Seaman, 2013).

Beyin bölgelerinde yapılan nörogörüntüleme çalışmaları, mezokortikolimbik sistemdeki bir işlev bozukluğunun obezite ile sonuçlandığını göstermiştir (Geliebter ve ark., 2006; Geiger ve ark., 2008; Karlsson ve ark., 2021). Prefrontal korteks (PFC), bu limbik ödül bölgelerinin düzenlenmesinin bir parçasıdır (Gluck ve ark., 2017). Yüksek enerji içeren yiyeceklere yanıt olarak PFC'nin uyarıldığı sonucuna varılmıştır (Killgore ve ark., 2003). Son zamanlarda, besin tüketimi ve enerji dengesinin düzenlenmesinde rolü olan endokannabinoid sisteme (EKS) ilgi artmıştır (Lau ve ark., 2017). Bu, beslenme regülasyonunun mezokortikolimbik sistemin bir parçası olarak PFC bölgesindeki endokannabinoid modülasyonuna ilişkin yeni bir yaklaşım olabilir. Çünkü EKS'nin aktivasyonu, abdominal obezitenin bir özelliğidir (Engeli, 2008) ve iştah düzenlenmesi, enerji dengesi ve besin tüketiminde potansiyel rolü olan EKS, obezitede aşırı aktif olabilmektedir (Schulz ve ark., 2021).

Vücutta zararlı etkilere neden olmadan iştahı baskılayarak enerji alımını azaltan besinler için en iyi seçeneklerden birisi fonksiyonel besinlerdir ve obezitenin önlenmesinde ilgi odağı haline gelmiştir (Alptekin ve ark., 2022). Daha önceki 8da, fonksiyonel besinler arasında yer alan inülinin genç sağlıklı kadınlarda tokluğu artırmada, açlığı ve enerji alımını azaltmada etkili olduğunu ve inülinin vücut yağ yüzdesini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur (Alptekin ve ark., 2021). Hume ve ark., (2017) inülin takviyesinin diğer yaşam tarzı değişikliklerinden bağımsız olarak subjektif iştah durumunu iyileştirdiği sonucuna ulaşmıştır (Hume ve ark., 2017). Benzer bir çalışmada, inülinin, prediyabetli bireylerde ağırlık kaybını sağladığı ve intrahepatoselüler ve intramiyoselüler lipidi miktarını azaltarak diyabet riski üzerinde iki yönlü bir etkiye sahip olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Guess ve ark., 2015). Ayrıca, inülin supplementasyonu, enerji dengesi üzerinde önemli etkileri olan leptin ve ghrelin düzeylerini azaltmıştır (Klok ve ark., 2007). Benzer sonuçlar yakın zamanda yapılan bir sistematik derleme ve meta-analizde özetlenmiştir ve inülinin obezite ve enerji alımı üzerindeki bu olumlu etkileri, diğer metabolik bozukluklar için de faydalı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (da Silva Borges ve ark., 2020).

Leptin ve ghrelin, enerji dengesi üzerinde etkili olan iki hormondur. Randomize kontrollü bir çalışmada, inülin takviyesinin leptin ve ghrelin düzeylerini azalttığı sonucuna ulaşılmıştır (Parnell ve Reimer, 2009). Güncel kanıtlar, Anandamid (AEA) ve 2-Araşidonoilgliserol (2-AG) başta olmak üzere endokannabinoidlerin iştah, besin tüketimi ve enerji metabolizmasında yer alabileceğini göstermektedir.

1.6. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı ve Endokannabinoid Sistem

Yağlı karaciğer hastalığının patogenezinin ve ilerlemesinin altında yatan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılamamıştır (Kitade ve ark., 2017). Stres ve diyetle yüksek yağ alımı gibi çevresel faktörler arasında iştah metabolizmasındaki disregülasyon da NAFLD'ye güncel yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Son yıllarda, iştah, besin alımı ve NAFLD'ye artan bir ilgi oluşmaktadır (Xia ve ark., 2019; Vancells-Lujan ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2022). Aşırı basit karbonhidrat tüketiminin hızla artmış serum glikoz düzeylerini ve reaktif hipoglisemiye indüklediği, açlık hissine, iştahın artmasına ve nihayetinde hiperfajiye neden olduğu bulunmuştur (Melanson ve ark., 1999). Sonuç olarak NAFLD'nin başlangıcı ve gelişimi diyet alışkanlıkları ve yaşam tarzı ile yakından ilişkili olduğundan, bu hastalar ve NAFLD gelişme riski taşıyanlar için terapötik beslenme yaklaşımlarının kaçınılmaz olduğu belirtilmektedir (Yasutake ve ark., 2014).

Son yıllarda, endokannabinoid sistem (EKS) olarak bilinen bir hücre içi sinyal sisteminin enerji dengesinin düzenlenmesinde, yeme davranışında, hepatik lipogenezde ve glikoz homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı araştırma konusu olmuştur (Alptekin ve Keser, 2017). Endokannabinoidler, kanabinoid reseptörlere bağlanabilen endojen yağ asit türevleridir. Adipoz dokuda kanabinoid reseptörlerin uyarılması ile lipoprotein lipaz aktivitesi artmakta böylelikle lipogenez başlamaktadır. Yağ kütlesinin artması, serbest yağ asit miktarının uygunsuz olarak artmasına, bu durum da dokularda insülin direnci gelişmesine yol açabilmektedir (Alptekin ve Keser, 2016). Tüm bunlar dikkate alındığında, hipotalamustaki reseptörler üzerinden iştah metabolizmasının düzenlenmesinde, lipid

metabolizmasındaki etkileri üzerinden insülin direnci gelişiminde önemli bir metabolik yolak olan endokanabinoid sistem ile NAFLD arasında güçlü bir ilişki olması muhtemeldir. Çünkü endokanabinoid sistem metabolik sendroma da neden olabilecek NAFLD ile ilişkili biyo belirteçler üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Yağlı karaciğer hastalıkları ile Anandamid (AEA) ve 2-Araşidonilgliserol (2-AG) düzeyleri arasında önemli bir ilişki olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Gabbay ve ark., 2005; Siegmund ve ark., 2007; Siegmund ve Schwabe, 2008; Izzo ve ark., 2009; Baldassarre ve ark., 2013; Zelber-Sagi ve ark., 2017).

Karaciğer dokularında bulunan kanabinoid reseptörlerinin karaciğer yağlanması neden olan lipid metabolizması üzerinde doğrudan etkileri bulunmaktadır. Özellikle yüksek yağlı diyet tüketiminin karaciğer dokularındaki kanabinoid reseptörleri (*Cnr1* ve *Cnr2*) stimüle ederek endokanabinoid sistemi aktifleştirdiği ve hepatik glikozu, glikojenolizi, lipogenezi, serbest yağ asidi sentezini, glikoneogenezi arttırarak insülin direnci ve hepatik steatoz gelişimine neden olduğu belirtilmektedir (Bazwinsky-Wutschke ve ark., 2019). Bu reseptörlerin çeşitli antagonistler ile inhibe edilmesiyle hepatik glikoz üretiminin azalacağı, insülin duyarlılığının artacağı ve yağlı karaciğer gelişiminin azaltılabileceği belirtilmektedir (González-Mariscal ve ark., 2016). Karaciğer dokularındaki lipid ve glikoz metabolizması üzerindeki etkileri kanıtlanırsa da EKS ile NAFLD arasındaki ilişkiye yönelik araştırmalara gereksinim vardır. Endokanabinoid yollarında yer alan kanabinoid reseptör ailesi iki G protein-coupled reseptör (GPCR), *Cnr1* ve *Cnr2*'den oluşmaktadır. Kanabinoid reseptörleri *Cnr1* ve *Cnr2*'nin her biri birden fazla metabolik yolu aktive etmektedir. Bu reseptörler hücre içi sinyal proteinlerinden etkilenmektedir. $\beta 2$ adrenerjik reseptörünün aktivasyonunun *Cnr1* varlığında değiştiği gösterilmiştir (Rasmussen ve ark., 2011A; Rasmussen ve ark., 2011B; Kumar ve ark., 2016). *Cnr1* geninin obezite, anksiyete, multiple skleroz, nikotin bağımlılığı, Huntington hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi bir dizi merkezi sinir sistemi bozukluklarında potansiyel rolü olduğu belirtilmektedir (Horvath ve ark., 2016). *Cnr1* ve *Cnr2* genlerinde yolak analizine bakıldığında, *Cnr1* geninin termogeneizde önemli rolü olduğu görülmektedir. *Cnr1* reseptörünün adenilat siklaz, beta-3 adrenerjik reseptör, guanin nükleotid bağlayıcı protein genlerinin aktivasyonunda etkileyerek adipositlerin lipolizinde görev

aldığı düşünülmektedir. Endokanabinoid sistemin inaktive edilmesi reseptör düzeyinde etkileri olan rimonabant gibi ajanlar ile sağlanabildiği ortaya konmuştur. Ancak ciddi nörolojik ve psikiyatrik yan etkileri nedeniyle Avrupa ülkelerinde yasaklanmıştır (Chorvat, 2013). Bu nedenle besin alımının kontrolünü sağlayan iştah regülasyonu, lipid ve karbonhidrat metabolizmaları gibi NAFLD ile yakından ilişkili olan metabolik yollara etki edebilecek etkenler güncel araştırmaların konusu olmaya başlamıştır (Tutunchi ve ark., 2019).

1.7. İnülinin Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Üzerine Etkileri

Diyet modifikasyonlarının NAFLD'yi önlemenin ve/veya iyileştirmenin yollarından biri olduğu düşünülmektedir. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri, diyetel lifler ve fenolik bileşikler gibi fonksiyonel besinlerden zengin diyetlerin NAFLD'nin tedavi ve önlenmesinde önemli olabileceği belirtilmektedir (Perdomo ve ark., 2019). Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının patofizyolojisinde yer alan ve yüksek yağlı diyet, aşırı enerji alımı ve sedanter yaşam gibi çevresel etmenlerin lipid ve karbonhidrat metabolizması üzerinden neden olduğu, ilk evrelerde fazla ağırlık/obezite ve insülin direnci, ileri evrelerde inflamasyon, son evrelerde fibrozis ve siroz düşünüldüğünde, fonksiyonel besinler ilgi konusu olmaya başlamıştır. Fonksiyonel besinler besin alımının düzenlenmesi üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle obezite tedavisindeki yerini almaya başlamıştır (Brown ve ark., 2015). İçeriğindeki fonksiyonel gruplar ve sağlık üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle diyetel lifler de fonksiyonel besinler arasındadır. Diyetel liflerin kısa zincirli yağ asidi sentezini doğrudan etkileyerek obezite üzerinde etkilerinin olabileceği düşünülmektedir (Weitkunat ve ark., 2017). Sindirilmeyen karbonhidrat kaynakları olan diyetel liflerin ve fermente edilebilen türlerinin besin alımını azalttığı uzun zamandır bilinmektedir (Wanders ve ark., 2011). Bu tür karbonhidratlar, gastrointestinal sistemde sindirim ve emilime uğramadan kolona geçerler ve bakteriyel fermentasyona uğrayarak iştah düzenlenmesine dahil olan GLP-1 gibi peptidlerin salınımını stimüle eden kısa zincirli yağ asitlerinin üretimini arttırırlar (Sleeth ve ark., 2010). Fermente edilebilen bu tür karbonhidratların doğal bir diyet bileşeni olarak halk

sağlığı açısından önemli olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, fermente edilebilen diyetset liflerin ağırlık kaybından bağımsız olarak vücutta metabolik olarak zararlı etkilere neden olabilecek lipid düzeylerini de azalttığı belirtilmektedir (Guess ve ark., 2015). Ektopik yağlanma olarak literatürde yer alan aşırı lipid birikimi insülin direnci ve obezite ile yakından ilişkilidir (Gaggini ve ark., 2013). Ektopik yağlanmanın önlenmesi ve tedavisi üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle diyetset liflerin NAFLD için besinsel kaynak olması muhtemeldir. Literatürde yer alan hayvan çalışmaları, özellikle prebiyotik liflerin NAFLD'nin seyrini değiştirme potansiyelinin umut verici olduğunu ortaya koymaktadır (Lambert ve ark., 2015, Ferolla ve ark., 2016).

Prebiyotik lifler arasında yer alan ve sağlık üzerinde olumlu etkilere sahip olan inülin fermente edilebilir diyetset lif türlerindendir (Tsurumaki ve ark., 2015). Yapılan bir çalışmada, yüksek yağlı diyet (enerjinin %42'i) eklenen inülin desteğinin (besin ağırlığının %10'u) 6 haftalık bir periyotta hayvanlarda lipogenez ve yağ asidi elangasyonu/desaturasyonunda yer alan genlerin hepatik ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı sonucuna ulaşılmıştır (Weitkunat ve ark., 2015). Yapılan başka bir çalışmada inülin desteğinin (%5) yüksek yağlı ve yüksek şükrozlu diyetle (sırasıyla %23,9 ve %56,8) 3 hafta beslenen ratlarda hepatik triačilgliserol ve toplam kolesterol (TK) düzeylerindeki yükselmeyi iyileştirdiğı ve tek başına inülin desteğinin ratlarda hepatik steatoz gelişimini önlemek için yeterli olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Sugatani ve ark., 2012). Literatürde benzer sonuçlara ulaşan birçok araştırma bulunmaktadır (Sugatani ve ark., 2006; Sugatani ve ark., 2008). İnülinin NAFLD üzerindeki olumlu etkileri arasında en fazla bulunan sonuçlar lipid metabolizması üzerinden etkileri nedeniyle serum ve karaciğer dokularında TG ve TK düzeylerindeki anlamlı azalmalardır (Kok ve ark., 1998; Wada ve ark., 2005; Sugatani ve ark., 2006; Sugatani ve ark., 2008). Dolayısı ile hepatoselüler steatozun, inflamasyonun ve dejenerasyonun karaciğerde fibroza, disfonksiyona ve maligniteye yol açabileceğı NASH hastalarında inülin benzeri prebiyotiklerin kullanılmasına yönelik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Parnell ve ark., 2011). İnülinin, hem NAFLD gelişimini önleyici etkileri hem de NASH tablosunu düzeltici etkileri nedeniyle NAFLD hastalık evrelerinin seyrini olumlu etkileyebilecek bir diyetset lif olduğu belirtilmektedir (Bao ve ark., 2020).

İnülinin NAFLD üzerindeki olası etkilerinin incelendiği araştırma sayısı fazla olsa da ortak bir protokol henüz bulunmamaktadır. Bu etkilerin hangi metabolik yollar üzerinden etkili olduğunun gösterilebilmesi için oluşturulan hayvan modelleri oldukça önemlidir. Batı tarzı beslenme olarak adlandırılan insan diyetine benzetmek için, hem karbonhidrat hem de yağ bakımından zengin olan diyetler hayvan çalışmalarında en çok kullanılan modellerdir (Panchal ve Brown, 2011; Moreno-Fernandez ve ark., 2018). Deneysel modeller iyi bir alternatif olsa da nonalkolik yağlı karaciğer hastalığının patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır (Lima ve ark., 2016).

Bu nedenle, bu tez kapsamında “İnülin desteği NAFLD gelişimini endokanabinoid yolağı üzerinden önleyebilir mi?” sorusuna cevap aranmıştır. Literatürde inülin desteğinin endokanabinoidler üzerinden NAFLD üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki ilk araştırma olan bu çalışmada “uzun süreli inülin desteği, diyetle indüklenen obeziteyi ve insülin direncini endokanabinoid sistem yolağı üzerinden azaltabilir ve NAFLD gelişimini önleyebilir” hipotezi doğrultusunda;

- Tez çalışmasının temel amacı; inülin desteğinin yüksek yağlı beslenme olmasına rağmen NAFLD gelişimini önleyici olası etkilerini endokanabinoid sistem üzerinden açıklamaktır.

- Tez çalışmasının ikincil amacı; inülin desteğinin iştah parametreleri olan ghrelin ve leptin düzeylerine ve vücut ağırlığı değişimi üzerine etkilerini incelemektir.

Ayrıca;

- Araştırmanın hipotezi ve amaçları doğrultusunda inülin desteğinin endokanabinoid düzeyi üzerindeki etkilerinin incelenmesi araştırmanın en güçlü özgünlüğüdür. Çünkü endokanabinoid sistem hem insülin direnci hem karaciğer yağlanması hem de iştaha etki eden endokrin kontrollü bir mekanizmalar bütünüdür. Aşağıdaki arama terimleriyle PUBMED’de eşleşen ilgili hiçbir çalışma bulunamamıştır (26.09.2019 / 02.12.2019 / 25.12.2019 / 01.01.2020 / 15.02.2020 / 27.02.2020 tarihlerinde);

- (endocannabinoid [Text Word]) AND (dietary fiber [Text Word])
- (endocannabinoid [Text Word]) AND (inülin [Text Word])
- (anandamide [Text Word]) AND (dietary fiber [Text Word])
- (anandamide [Text Word]) AND (inülin [Text Word])
- (arachidonyl glycerol [Text Word]) AND (dietary fiber [Text Word])
- (arachidonyl glycerol [Text Word]) AND (inülin [Text Word])

- Moleküler veri tabanı olan “Genler ve Genomların Kyoto Ansiklopedisi (KEGG)” nde inülin diyetel lifinin endokannabinoid yolağı üzerinden karaciğer yağlanması etkileyen bir metabolik yolağı bulunmamaktadır.

- Araştırma konusu ile ilgili literatürdeki birçok deneysel hayvan model çalışmasında inülin desteğı, belirlenen hastalık geliştirildikten sonra diyetle eklenmiştir. Bu araştırma yönteminde çalışma grupları kontrol diyeti ile beslenen grup, kontrol diyetine inülin eklenen grup, yüksek yağlı diyetle beslenen grup ve yüksek yağlı diyetle inülin eklenen grup olarak belirlenmiştir. Bu sayede yüksek yağlı diyetle eklenen inülin desteğinin, yüksek yağlı beslenme olmasına rağmen insülin direnci ve karaciğer yağlanması gibi sağlık sorunlarını önleyici olası etkileri incelenmiştir. Ayrıca bu etkileri gözleyebilmek için belirlenen gruplara verilen diyet içeriklerinin araştırmacılar tarafından hazırlanmış olması da bir özgünlük olarak düşünülmektedir.

- Araştırma kapsamında yer alan inülin desteğı ile iştah belirteçleri olan leptin ve ghrelin düzeyleri arasındaki ilişkiye yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Bu araştırmada inülin desteğinin lipid parametreleri üzerindeki etkileri ortaya konarak insülin direnci üzerindeki ve yağlı karaciğere etkileri ile iştah metabolizması üzerindeki etkileri arasındaki ilişki incelenmiştir. Çünkü inülin literatürde yağ ikamesi

olarak yer almaktadır. Bu metabolik yollar ile iştah metabolizması arasındaki ilişkinin birlikte incelenmesi bu araştırmanın 6zg6n y6nlerinden bir diğeri



2. GEREÇ VE YÖNTEM

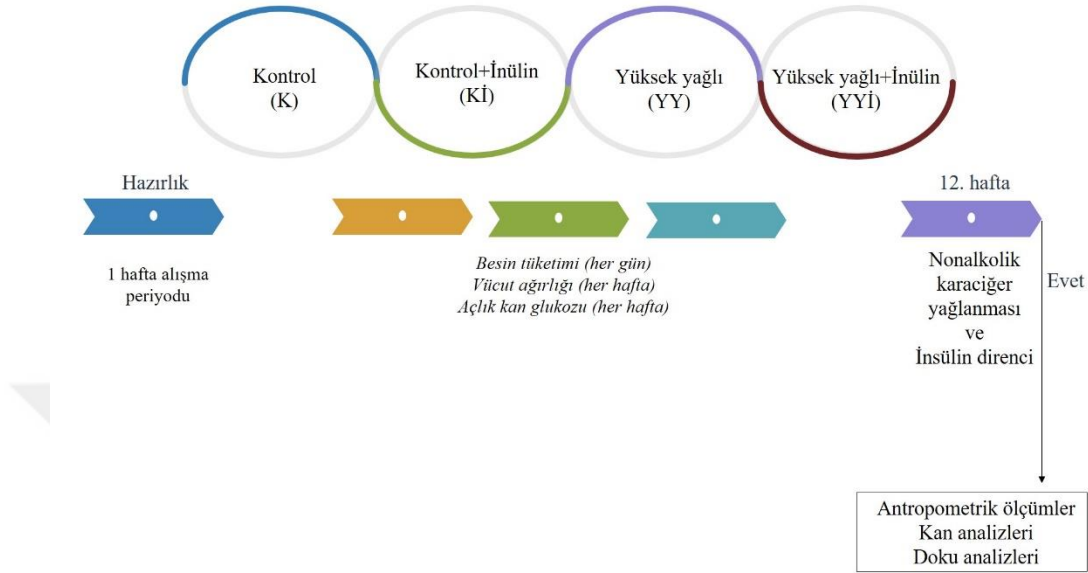
2.1. Araştırma Yeri, Zamanı, Örneklem Seçimi ve Araştırma Tasarımı

Dört gruptan oluşan ve toplam 25 rat üzerinde yürütülen bu araştırma için Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 05.02.2020 tarihli ve 2020-3-20 karar no'lu etik kurul onayı alınmıştır (EK-1). Bu araştırma 16.06.2020 tarihli ve 120S225 proje numaralı TÜBİTAK 1002-Hızlı Destek Programı kapsamında desteklenmiştir (EK-2).

Araştırmada yağlı karaciğer gelişimi takip edileceği için örneklemi oluşturacak hayvanlar Wistar türü ratlar olarak belirlenmiştir (Kohli ve Feldstein, 2011; Takahashi ve ark., 2012). Tüm ratlar on aylık, sütten kesilmiş ve erkektir. Ratların temini, bakımı, araştırmaya hazırlanması, müdahale periyodu, ratların ötenazisi, kan ve dokuların toplanması ile araştırmanın sonlandırılması Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Ratlardan elde edilen karaciğer örnekleri karaciğer yağlanması kontrolü için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında incelenmiştir. Beyin ve karaciğer dokularındaki endokanabinoid düzeyleri Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi İlaç ve Kozmetik Ar-Ge ve Kalite Kontrol Laboratuvarında (HÜNİKAL) ölçülmüştür. Kan örneklerindeki biyokimyasal parametreler ile karaciğer ve beyin dokularının genetik incelemeleri özel bir laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Araştırma, 12 hafta süren, randomize kontrollü ve paralel tasarımlı olarak planlanmıştır. Araştırma grupları, Kontrol (K), Kontrol+İnülin (Kİ), Yüksek yağlı (YY) ve Yüksek yağlı+İnülin (YYİ) olmak üzere toplam 4 gruptan oluşmaktadır. Araştırma merkezinden temin edilen ratlar K (n=6), Kİ (n=6), YY (n=7) ve YYİ (n=6) olarak rastgele gruplandırılmıştır (Şekil 2.1). Her gruptaki rat sayısı için benzer çalışmalarındaki (yüksek yağlı diyetle karaciğer yağlanması indüklenen) rat sayıları referans alınmıştır (Sugatani ve ark., 2012; Yan ve ark., 2015; Davoodi ve ark., 2017;

Haque ve ark., 2019). Yüksek yağlı diyet grubunda bir rat NAFLD kontrolünde ötenazi edildiği için sayısı diğer gruplardan bir adet fazla olmuştur.



Şekil 2.1. Araştırma akış şeması

Haziran 2020’de ratların üretimi başlamıştır ve ratların 10 haftalık olduğu Eylül 2020’de bir hafta boyunca yemlerin tüketimleri gözlenerek tüketilebilirlikleri test edilmiştir. Tüm gruplarda yem tüketimi başarılı bulunmuştur ve 29.09.2020 tarihinde araştırmanın müdahale periyodu başlamıştır.

Yağlı karaciğer hastalığında genetik modeller ve diyetle indüklenen modeller gibi birçok deneysel hayvan modeli bulunmaktadır. Yüksek yağlı diyetle indüklenen hayvan modellerinin insülin direnci, dislipidemi ve obezite oluşturmak için kullanılan en etkili yöntem olduğu belirtilmektedir (Van Herck ve ark., 2017; Jensen ve ark., 2018). Bu araştırma yöntemindeki protokol literatür verilerine uygun olarak hazırlanmıştır ve modelleme sonucu 12 haftalık periyotta karaciğer yağlanması gözlenmiştir.

Araştırmanın 12. haftasında YY grubundan bir ratta karaciğer dokusunun patoloji analizleri ile yağlı karaciğer oluşma durumu tespit edilmiştir ve müdahale

periyodu 28.12.2020 tarihinde sonlandırılmıştır. Tüm ratlar 30.12.2020 tarihinde ötenazi edilerek kan ve doku örnekleri alınmıştır. Tüm numuneler analiz günlerine kadar -80°C koşullarda saklanmıştır.

2.2. Ratların Temini, Bakımı ve Takibi

Her biri on aylık olan 25 erkek Wistar türü rat (ortalama 240.1±30.8g) Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarından temin edilmiştir. Hayvanlar araştırmanın hazırlık periyodu olan ilk bir haftada ve araştırmanın müdahale döneminde yem ve suya ad libitum olarak ulaşmışlardır. Uygun koşulların sağlanması konusunda araştırma yeri ile iş birliği içerisinde ratlar için en uygun koşullar sağlanmıştır. On iki saat gündüz 12 saat gece döngüsü (ışıkların açılması sabah 08:00'da ve ışıkların kapanması saat 20:00'de), 20±2°C ortam sıcaklığı ve %40-60 nem oranı ayarlaması yapılmıştır. Araştırma süresince ratların besin tüketimi hergün, ağırlık ve açlık kan glukozu her hafta ve Lee obezite indeksi 6 haftada bir ölçülmüştür. Araştırmanın tamamı Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu izni doğrultusunda, Helsinki Hayvan Hakları deklarasyonuna uygun olarak ve 3R (Replacement, Reduction and Refinement) kuralı takip edilerek yürütülmüştür.

2.3. Diyet Müdahalesi

Toplam 4 gruptan oluşan bu araştırmadaki ratlara aynı enerji miktarına ve farklı makro besin ögesi örüntüsüne sahip bir beslenme protokolü uygulanmıştır (Çizelge 2.1). Araştırmada ratların beslenmesinde kullanılan tüm yemlerin içerikleri araştırmacılar tarafından belirlenmiştir, özel bir firmada (Arden Araştırma & Deney, Ankara) üretilmiştir ve ratlara taze ve günlük olarak verilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.1. Araştırma için hazırlanan diyetlerin enerji ve makro besin ögesi örüntüleri*

Enerji ve makro besin ögesi	K		Kİ		YY		YYİ	
	g	kkal%	g	kkal%	g	kkal%	g	kkal%
Karbonhidrat	700	70	700	70	345.6	35	345.6	35
Protein	203	20	203	20	203	20	203	20
Yağ	45	10	45	10	202.5	45	202.5	45
Toplam enerji (kkal)**	4057		4057		4057		4057	
Toplam enerji (kkal/g)	3.85		3.85		4.73		4.73	

K; Kontrol, Kİ; Kontrol+İnülin, YY; Yüksek yağlı, YYİ; Yüksek yağlı+İnülin, g; gram, kkal; kilokalori, kg; kilogram.

***Hazırlanan diyetler uluslararası standartlara sahip olan diyetler ile eşdeğerdir (kontrol diyeti için D12450K, yüksek yağlı diyet için D12451 referans alınmıştır).**

****Sindirim ve emilim sonrası metabolize edilebilen enerji.**

Hazırlık dönemi de dahil olmak üzere tüm araştırma boyunca beslenme planı olarak verilen yemlerin içerikleri lezzet, kıvam ve görüntü yönünden de ratların tüketimini sağlayabilecek şekilde hazırlanmıştır (Zou ve ark., 2006; Azuma ve ark., 2007; Kismet ve ark., 2017; Kitada ve ark., 2018).

Çizelge 2.2. Araştırmada kullanılan yemlerin içerikleri*

İçerik	K	Kİ	YY	YYİ
Sükroz (g)	-	-	172.8	172.8
Mısır nişastası (g)	550	550	72.8	72.8
Maltodekstrin (g)	150	150	100	100
Selüloz (g)	50	50	50	50
Kazein (g)	200	200	200	200
Metiyonin (g)	3	3	3	3
Mısır yağı (g)	25	25	25	25
Tereyağı (g)	20	20	177.5	177.5
Mineral mix (g) (S10026)	10	10	10	10
Dikalsiyum fosfat (g)	13	13	13	13
Kalsiyum karbonat (g)	5.5	5.5	5.5	5.5
Potasyum sitrat monohidrat (g)	16.5	16.5	16.5	16.5
Vitamin mix (g) (V10001)	10	10	10	10
Kolin bitartarat (g)	2	2	2	2
Renk (FD&C Red Dye#40) (g)	0.025 (Mor)	0.025 (Yeşil)	0.05 (Turuncu)	0.05 (Kahverengi)
İnülin**	-	15	-	15

K; Kontrol, Kİ; Kontrol+İnülin, YY; Yüksek yağlı, YYİ; Yüksek yağlı+İnülin (kontrol diyeti için D12450K, yüksek yağlı diyet için D12451 referans alınmıştır).

***Hazırlanan diyetler ad libitum olarak tüketilmiştir.**

****İnülin (Frutafit ® CLR, Sensus, Roosendaal, Netherlands) diyetset lifi kullanılmıştır. İnülin miktarı, toplam besin ağırlığının (g) yüzdesi olarak ifadesidir.**

2.4. Ötenazi İşlemi, Numunelerin Toplanması ve Analiz Edilmesi

Araştırmanın 12. haftasında yüksek yağlı diyetle beslenen grupta karaciğer yağlanması gelişimi gözlemlendikten sonra araştırma sonlandırılmıştır. Bir gün önceden aç bırakılan ratlar için ötenazi işlemi Xylazine (10mg/kg) ve Ketamin HCl (90mg/kg) aneljezikleri ile kombine şekilde intramüsküler enjeksiyonla yapılmıştır. Ardından ilk

olarak kalpten kan alınmıştır. Alınan kanlar jelli tüplere koyularak santrifüj edilmiştir ve serumları -80°C saklama koşullarına götürülmüştür. Ardından diğer organların diseksiyonu işlemi ile numuneler toplanmıştır. Diseksiyon işlemi sonrası ilk olarak karaciğer ve beyin dokularının ağırlıkları 0.0001 g duyarlı hassas terazide tartılmıştır (Radwag AS220R2, Poland). “Organ ağırlığı (g) / son vücut ağırlığı (g) × 100” formülü (Omagari ve ark., 2020) kullanılarak karaciğer ve beyin organ indeksleri hesaplanmıştır. Karaciğer organı %10'luk formalin çözeltisi içerisinde patoloji laboratuvarına götürülmüştür. Aynı zamanda karaciğer ve beyin dokularının örnekleri alikotlama işlemi sonrasında hızlı bir şekilde sıvı azot içinde şoklanmıştır ve kurubuz kutuları içerisinde -80°C depolara hızlıca taşınmıştır. Tüm numuneler analiz edilene kadar uygun koşullarda saklanmıştır.

2.4.1. Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı, Obezite ve İnsülin Direnci Değerlendirilmesi

2.4.1.1. Histopatoloji Analizleri

Histopatolojik analizler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında uzman bir patolog eşliğinde tek kör olarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra %10'luk formalin solüsyonuna alınan doku örnekleri 24 saat bekletilmiştir. Analiz öncesi doku takip prosedürleri uygulanmıştır ve numuneler parafin bloklara gömülmüştür. Bloklardan 4 µm'lik dilimler kesilerek Hematoksilen ve Eozin (H&E) ve Masson Trichrome ile boyanmıştır. Hazırlanan preparatlar BX50 model Olympus ışık mikroskopunda (Olympus BX50, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) incelenmiştir. Karaciğer dokuları histopatolojik olarak steatoz (mikroveziküler ve makroveziküler), lobüler inflamasyon, hepatosit balonlaşması ve fibrozis gelişimi açısından skorlanarak değerlendirilmiştir (Çizelge 2.3). Skorlama sisteminde; steatoz (0-3), lobüler inflamasyon (0-2), hepatoselüler balonlaşma (0-2) kullanılarak toplam nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı aktivite skoru (0-8) hesaplanmıştır (Kleiner ve ark., 2005).

Çizelge 2.3. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı aktivite skoru değerlendirilmesi

Steatoz derecesi (0-3)	Lobüler inflamasyon (0-3)	Hepatoselüler balonlaşma (0-2)
0: <%5	0: Yok	0: Yok
1: %5-33	1: <2 odak/20xalan	1: Hafif, az
2: %34-66	2: 2-4 odak/20xalan	2: Orta/belirgin, çok
3: >%66	3: >4 odak/20xalan	
<i>Toplam NAFLD aktivite skoru (NAS) (0-8)</i>		
Fibrozis		
0	Fibrozis yok	
1a.	Hafif şiddette zon 3 sinüzoidal fibrozis	
1b.	Orta derece şiddette zon 3 sinüzoidal fibrozis	
1c.	Sadece portal fibrozis	
2.	Zon 3 sinüzoidal fibrozis ve periportal fibrozis	
3.	Köprüleşme fibrozisi	
4.	Sirozis	

NAFLD; Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, NAS; Toplam NAFLD skoru.

2.4.1.2. Obezite Durumu Değerlendirilmesi

Ratların ağırlığı obezite gelişimi açısından Lee obezite indeksine göre değerlendirilmiştir (Hill ve ark., 2019) ve 310'dan büyük değerler obezite göstergesi olarak kabul edilmiştir (Hariri ve Thibault, 2010).

$$\text{-Lee İndeksi (g/cm}^3\text{)} = \sqrt[3]{\text{Vücut Ağırlığı (g) / NazoAnal Uzunluk (cm) x 100000}}$$

2.4.1.3. İnsülin Direnci Değerlendirilmesi

İnsülin direnci HOMA-IR indeksi kullanılarak değerlendirilmiştir (Peris-Sampedro ve ark., 2019) ve 3'ten büyük değerlerin insülin direnci göstergesi olduğu belirtilmektedir (Shimada ve ark., 2007; Hui ve ark., 2013).

- HOMA-IR= Açlık Glukoz Düzeyi (mmol/l) x Açlık İnsülin Düzeyi (μU/ml) / 22.5

2.4.2. Kan ve Doku Analizleri

Araştırmanın sonlandırma süreci araştırma süresince olduğu gibi etik ilkeler dahilinde yürütülmüştür. Tüm ratlardan genel anestezi altında kalpten kan alınmıştır (2-3 ml) ve santrifüj edilerek plazma ve serumlar elde edilmiştir. Kan numuneleri ilk olarak pıhtı aktivatörlü serum ayırıcı tüpe alınmıştır. Pıhtılaşma sürecini kolaylaştırmak için tüplere beş-altı kez çalkalama işlemi uygulanmıştır. Pıhtı oluştuktan sonra (yaklaşık 30 dakika içinde) numuneler santrifüj edilmiştir. Araştırma amacı kapsamında karaciğer ve beyin dokuları analiz edilmiştir ve diğer organlar ileri çalışmalarda kullanılmak üzere uygun koşullarda saklanmaya devam etmektedir.

2.4.2.1. Histopatoloji Analizleri

Santrifüj işlemi jelli tüplere alınan kanların oda sıcaklığında 30-45dk bekleme işleminden sonra 3000 Rpm'de 10dk süre ile gerçekleştirilmiştir (#NF200, Bench-Top, Turkey). Daha sonra numune serumları pipet yardımı ile 3 kere alikotlanarak eppendorf tüplere alınmıştır ve analize kadar -80°C'de saklanmıştır. Ratlardan elde edilen bu numunelerde; glukoz, insülin, kan lipid parametreleri (Düşük dansiteli lipoprotein; LDL, yüksek dansiteli lipoprotein; HDL, Trigliserit; TG, Total kolesterol, TK), (Alanin aminotransferaz; ALT, Aspartat aminotransferaz; AST, adiponektin, leptin ve ghrelin düzeyleri ölçülmüştür. Bu parametrelerden insülin, leptin, ghrelin ve adiponektin düzeyleri üreticilerin talimatlarına göre ticari rat kitleri kullanılarak

Sandwich- Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemine göre analiz edilmiştir. Diğer parametreler için Tam Otomatik Biyokimya Analizatör yöntemi kullanılmıştır.

2.4.2.1.1. Tam Otomatik Biyokimya Analizatör Analizleri

Glukoz; plazma glukoz analizi hazır kit yardımı ile kit içeriğindeki talimatlara uygun olarak kolorimetrik yöntemle dublike olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen glukoz konsantrasyonları ile oluşan absorbanslar hazır kitte bulunan talimatlara göre uygun dalga boylarında mikro plak okuyucu ile okunmuştur. Standart glukoz solüsyonunun absorbans değerlerine göre oluşan glukoz standart eğrisi ile numunelerdeki absorbans değerleri kullanılarak glukoz konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır ve sonuçlar mg/dl olarak ifade edilmiştir.

Kan lipid parametreleri (LDL, HDL, TG, TK); HDL, VLDL ve şilomikronlar elimine edildikten sonra reaksiyon için özel koşulda oluşturulan ve reaktif olmayan bileşiklerdeki renk reaksiyonları ile LDL düzeyi belirlenmiştir. LDL, VLDL ve şilomikronlar elimine edildikten sonra reaksiyon için özel koşulda oluşturulan ve reaktif olmayan bileşiklerdeki renk reaksiyonları ile HDL düzeyi belirlenmiştir. Kolesterol esterlerinin parçalanması ile oluşan kırmızı renk yoğunluğuna göre TK düzeyi belirlenmiştir. Trigliseritlerin hidrolizi ile oluşan gliserol moleküllerindeki renk reaksiyonları ile TG düzeyleri hesaplanmıştır. Renk reaksiyonlarında kinon boyası kullanılmıştır ve sonuçlar mg/dl olarak gösterilmiştir.

Alanin Aminotransferaz (ALT), Aspartat Aminotransferaz (AST); Alanin ve 2-ogsoglutarat metabolitleri arasındaki transaminasyon sonucunda NADH miktarındaki değişiklik kullanılarak ALT düzeyi, α -ketoglutarat ve L-aspartat metabolitleri arasındaki transaminasyon sonucunda NADH miktarındaki değişiklik kullanılarak AST düzeyi hesaplanmıştır ve sonuçlar U/l olarak gösterilmiştir.

2.4.2.1.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Analizleri

Analizler hazır kit yardımı ile kit içeriğindeki talimatlara uygun olarak Sandwich-ELISA yöntemi ile dublike olarak gerçekleştirilmiştir. İnsülin (Shanghai Korain Biotech Co., Ltd Cat. No: E0707Ra), leptin (Shanghai Korain Biotech Co., Ltd Cat. No: E0561Ra), ghrelin (Shanghai Korain Biotech Co., Ltd Cat. No: E0896Ra) ve adiponektin (Shanghai Korain Biotech Co., Ltd Cat. No: E0758Ra) hazır kitleri kullanılmıştır. Analizler hazır kitlerde yer alan protokollere uygun olarak yürütülmüştür.

Analiz sonucunda elde edilen parametrelerin konsantrasyonları ile oluşan sarı renk yoğunluğuna bağlı absorbanslar 450 nm dalga boyunda mikro plak okuyucu ile okunmuştur. Standart parametre solüsyonunun optik yoğunluk değerlerine göre oluşan parametre standart eğrileri ile numunelerdeki optik yoğunluk değerleri kullanılarak sonuçlar elde edilmiştir.

2.4.2.2. Doku Analizleri

Ötenazi işleminden ve kan alındıktan sonra analizler için organlar dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır. Karaciğer ve beyin dokularının ilk olarak ağırlıkları tartılmıştır. Daha sonra beyin numunelerinden prefrontal korteks (PFC) bölgesi disekte edilmiştir (Paxinos ve Watson, 2006). Dokular sıvı azot içerisinde şoklandıktan sonra kuru buz kutuları içinde taşınarak uygun koşullarda (-80°C) saklanmıştır. Karaciğer ve beyin dokularında gen analizleri (gerçek zamanlı PCR) ve kromatografik analizler (LC-MS/MS) ile araştırma tamamlanmıştır.

2.4.2.2.1. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri

Ratların karaciğer ve beyinleri hızlı bir şekilde disekte edilmiştir ve analizleri yapılana kadar -80°C de saklanmıştır. Özellikle bu dokularda lokalize olan *Cnr1* ve

Cnr2 aktiviteleri kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) yöntemi ile belirlenmiştir. Beyin ve karaciğer dokularında *Cnr1* ve *Cnr2* aktivitelerine ek olarak endokanabinoid sistemin gen düzeyindeki metabolik yolları için qPCR yöntemi ile *Trpv1*, *Adrb3*, *Pnpla3*, *Gnas* ve *Adcy1* genlerinin aktivasyonlarına bakılmıştır. Bu genlerin primerleri NCBI/Primer-BLAST aracı kullanılarak tasarlanmıştır ve primerlere ait baz dizilimleri Çizelge 2.4’te gösterilmektedir.

Çizelge 2.4. Gerçek zamanlı qPCR analizleri için belirlenen gen primerlerinin baz dizilimleri

Primer gen	Baz dizilimi
<i>Cnr1</i>	F: ATAAGAGCGATGGCATAAC
	R: TTAGATACGGATATTGGAAGAA
<i>Cnr2</i>	F: TTAAGGTCAAGTGAAGGT
	R: ACATAGCGATTAGAGTAGAA
<i>Trpv1</i>	F: TGATTGAGAAGATGATCC
	R: ATAGGCAGAGAGTTATTC
<i>Adrb3</i>	F: CAAGGAGCCTGACTTCTG
	R: TCATTGGTTCTGGAGAGTTG
<i>Adcy1</i>	F: CGGAACATGGATCTCTAT
	R: CTTGTAGAAGTCCTTGTC
<i>Pnpla3</i>	F: CTGATGTGAAGGTGATGG
	R: ATTACAGATGCCGTTCTC
<i>Gnas</i>	F: ATCTCTGTGATCCTCTTC
	R: AGTAGTCCTCAATCTTCG
<i>Actb</i>	F: GAAGATCAAGATCATTGCTCCT
	R: TGGAAGCTGGACAGTGAG

***Cnr1*; Kanabinoid reseptör 1, *Cnr2*; Kanabinoid reseptör 2, *Trpv1*; Transient reseptör potansiyel vanilloid 1, *Adrb3*; β 3-adrenerjik reseptör, *Adcy1*; Adenilat siklaz 1, *Pnpla3*; Patatin benzeri fosfolipaz 3, *Gnas*; G-protein uyarıcı subunit α için gen kodu, *Actb*; Aktin beta (kontrol gen). F; Forward, R; Reverse.**

Bu yöntem; Total RNA Ekstraksiyonu, Nükleik Asitlerin Spofotometrik Ölçümleri (nano gram değerleri) ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi, Reverse Transkriptaz (cDNA) İşlemi ve qPCR mRNA Gen Ekspresyon Analizleri aşamalarından oluşmaktadır.

Numunelerdeki toplam RNA, gen ekspresyonlarını belirlemek için Trizol yöntemi (Rio ve ark., 2010) kullanılarak karaciğer ve beyin numunelerinden ekstrakte edilmiştir;

Dokulardan 150 mcg alınarak üzerine fiziksel parçalanma için 5-10mcg zirkonyum ve kimyasal parçalanma için 1 ml trizol çözeltisi (#15596018, Thermo Fisher Scientific, Ambion) konulmuştur. Daha sonra numuneler homojenizatöre konularak 4000 Rpm'de 2*30 sn ile homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası numuneler 5dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası numuneler +4°C'de 12.000 Rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Beyin dokuları 100 µL karaciğer dokuları 300 µL'de sabitlenmiştir.

Homojenizasyon işlemi sonrasında faz ayrımı gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası numunelere 200 µL kloroform eklenmiştir ve 15 sn vorteks edilmiştir. 1-2 dakika inkübe edildikten sonra +4°C'de 12.000 Rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası üst kısımda yer alan RNA çözeltisi elde edilmiştir.

Elde edilen RNA çözeltisinde RNA çöktürme işlemi yapılmıştır. İlk olarak eppendorf tüplere 500 µL isopropanol eklenmiştir. Üzerine RNA çözeltileri konularak 10 dk inkübasyona maruz bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası numuneler +4°C'de 12.000 Rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında oluşan pelletler (dibe çöken) zarar görmeyecek şekilde üst kısımdaki sıvı uzaklaştırılmıştır.

Elde edilen pelletlerin üzerine RNA yıkanması işlemi için PCR inhibitörü olan %75'lik 1ml etanol eklenmiştir. Daha sonra numuneler +4°C'de 7.500 RPM'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz iyice uzaklaştırılana kadar pelleti oynatmadan üstteki sıvı kısım boşaltılmıştır.

RNA çözdürülmesi işlemi için eppendorf tüplerin üzerine 100 µL ultra pure su eklenmiştir. Kısa bir süre vorteks işlemi sonrası RNA'ların tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Tüm numuneler diğer analizler için -20°C'de saklanmıştır.

Analizler için cDNA elde edilmeden önce mikrospektrofotometri denemesi yapılmıştır (Titertek Berthold, Germany). 2 µL numune cihaza yerleştirilerek tüm numuneler için A260/A280 oranının 1.8 ile 2.1 arası olduğu doğrulanmıştır.

Tüm uygulamalardan sonra cDNA elde edilmesine geçilmiştir. Bu elde için yapılan tüm işlemler RNA'ların yapısal bütünlüğünü korumak için soğuk plaklar üzerinde yürütülmüştür. Ayrıca RNA çözeltisi içindeki diğer sıvı kısmın etkisini ortadan kaldırmak için blank işlemi uygulanmıştır. -20°C'deki eppendorf tüpler çözdürülmüştür ve 5-10 sn spin işlemi yapılmıştır. Oda koşullarında altında soğuk plak üzerinde iyice çözünmesi sağlanmıştır. 1-2 sn vorteks işlemi sonrası floresan spektrofotometrede kontaminasyon ve uygun çözünürlük miktarlarını hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar için blank uygulanmıştır. Bunun için cihazda 2 µL ultra pure su kullanılmıştır. Daha sonra numunelerden 2 µL alınarak cihaza yerleştirilmiştir A260/A280 oranının standart oranına dikkat edilerek sonuçlar ng/ml olarak not edilmiştir. Tüm sonuçlar 1000 ng için kalibre edilmiştir ve her numune için ayrı ayrı hesaplanmıştır. PCR tüpleri soğuk kolon üzerine dizilmiştir ve her numune için hesaplanan miktarlar aynı sıra ile tüplere konulmuştur. Toplam miktar 13 µL olacak şekilde PCR grade su ile tamamlanmıştır. Daha sonra üzerine 4 µL 5X RT buffer solüsyonu, 1 µL dNTP, 1 µL RTase, 20 µL nükleaz içermeyen su konulmuştur. Tüm çözeltiler konulduktan sonra 1-2 sn spin işlemi yapılarak numuneler cDNA eldesi için cihaza yüklenmiştir (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler). Cihazda +25°C'de 10 dakika, +50°C'de 30 dakika, +85°C'de 5 dakika ve +4°C'de bekleme işlemleri sonrası cDNA'lar elde edilmiştir.

Real time PCR analizi işlemleri protokole uygun olarak real time cihazı ile yürütülmüştür (Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems). Öncelikle gen primerleri hazırlanmıştır. Numunelerin üzerine 100 mikromolar olacak şekilde PCR-grade su konulmuştur. 1-2 sn vorteks ve 1-2 sn spin işlemleri uygulanmıştır. Daha sonra 2 µL cDNA, 10 µL mastermiks (BrightGreen 2X qPCR MasterMix, ABM, USA), 5 µL primer çözeltisi (500mg forward, 500mg reverse ve H2O) ve 3 µL PCR grade su konularak 20 µL çözeltiler hazırlanmıştır. Optimizasyon işlemi için deneme yapıldıktan sonra numuneler tüm genler için PCR cihazında analiz edilmiştir. Cihaz

ayarları sırası ile; 95°C’de 5 dk, daha sonra 40 cycle ile 95°C’de 10 sn ve 60°C’de 30 sn, melting için 95°C’de 15 sn ve 60°C’de 1 dk, son olarak 60°C’den 95°C’ye okuma işlemi ile analizler tamamlanmıştır.

Ekspresyon verilerini değerlendirmek için Threshold Cycle (eşik değer döngü, CT) değerleri arasındaki farklılıklar ölçülerek hesaplanmıştır. İlk anlamlı artışın olduğu noktadaki veriyi yansıtan CT değerleri, her bir grup ve her bir gen için duplike olarak çalışılmış ve ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir. Kantitatif PCR sonuçları, $2^{\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre analiz edilmiştir. Tüm örnekler için hem hedef gen hem de referans gen olan *Actb* için Ct değerleri alınmıştır. Sonrasında fold change değerleri;

$$\Delta Ct = Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referans gen},$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muamele edilen} - \Delta Ct \text{ kontrol},$$

Ekspresyon oranı = $2^{\Delta\Delta Ct}$ formülleri hesaplanmıştır ve tüm gruplar, kendi içinde kontrol grubuna göre normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001; Willems ve ark., 2008).

2.4.2.2.2. Kromatografik Analizler

Beyin ve karaciğer dokularındaki Anandamid (AEA) ve 2- Araşidonilgliserol (2-AG) katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile ekstrakte edilmiştir, saflaştırılmıştır ve LC MS/MS yöntemi ile miktar tayini yapılmıştır (Köse ve ark., 2018; Abohalaka ve ark., 2020). Bu sistem LC-ESI-MS/MS, tandem kütle spektrometresi (Shimadzu 8030 MS/MS) ile birleştirilmiş bir Shimadzu LC-20AXR sisteminden oluşmaktadır.

Numuneler pozitif elektrosprey iyonizasyonunda çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanılarak analiz edilmiştir. Standart solüsyonlar olarak AEA (#A0580, Sigma-Aldrich, Germany) ve 2-AG (#A8973, Sigma-Aldrich, Germany) kullanılmıştır. Kolon olarak C18 kolon (GL Sciences ODS4, 50 x 3.0 mm, 2.1 µm)

kullanılmıştır. Hareketli faz (Gradient elüsyon) için % 0.1 Formik asit içeren su (h: h) (faz A) ve % 0.1 Formik asit içeren asetronitril (h: h) (faz B) kullanılmıştır. Uygulanan gradyan profili sırasıyla; Zaman (dk) 0,01-4,00-7,00-7,01-10,00 ve %Faz B 40-80-80-40-40 'tır. Akış hızı; 0.3 ml/dk, Kolon sıcaklığı; 40°C ve Enjeksiyon hacmi; 10 µL'dir. MS parametreleri ise; Arayüz voltajı; 4,5 kV, DL sıcaklığı: 250°C, Isı bloğu sıcaklığı: 400°C, Nebülizör ve kurutma gaz akış hızı sırasıyla 3 mL/dk ve 15 L/dk'dır. MRM geçişleri; AEA kantifikasyonu için 348,10 → 62,10 m/z (collision energy: -19 kV), 2-AG kantifikasyonu için 379,30 → 287,20 m/z (collision energy: -12 kV)'dir ve Bekleme süresi (dwell time) her iki geçiş için 200 ms'dir. Artan derişimde (1-1000 ng/mL) AEA ve 2-AG standartları ve sabit derişimde (10 µL) iç standart (ACPA: 500 ng/ml, cat#1318, Tocris Bioscience) içeren kalibrasyon çözeltileri numuneler ile aynı SPE koşullarında hazırlanmış ve LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Analizler sonucunda kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve doku numunelerindeki AEA ve 2-AG miktarları bu kalibrasyon eğrilerinin denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Kısaca bu yöntemde, havanda dokular sıvı azot altında toz hale getirildikten sonra metanol:su karışımı ile ekstre edilmiştir. Bu ekstreler katı faz kartuşları (SPE) kullanılarak AEA ve 2-AG derişimi arttırılırken endojen safsızlıklar uzaklaştırılmıştır ve sonrasında bu numuneler LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilmiştir. Her bir doku türü için günlük kalibrasyon eğrileri oluşturularak dublike olarak analiz edilmiştir. Kromatografik koşullarda yüksek verimli numune hazırlamak için polimerik sorbent kartuşları (Strata-X SPE 0.5 mL) kullanarak katı faz ekstraksiyonu (SPE) gerçekleştirilmiştir. Bu kartuşlar metanol ile aktive edildikten sonra numuneler (250 µl) kartuşlardan geçirilmiştir. Daha sonra kartuşlar su:metanol karışımı (45:55 hacim oranı) ile yıkanmıştır. AEA ve 2-AG elüsyonu 2 mL MeOH ile gerçekleştirilmiştir. 2-AG ve AEA'nın kalibrasyon eğrileri, yedi seviyedeki (1, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 ng/mL) konsantrasyona karşı analitin pik alanının iç standart pik alanına oranı kullanılarak oluşturulmuştur. Kromatografik ayırma, 0.3 mL/dakika akış hızında ve %0.1 formik asit içeren LC-MS/MS-grade asetronitril ile %0.1 formik asit içeren LC-MS/MS-grade sudan oluşan mobil faz kullanılarak kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir.

2.5. Verilerin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

Araştırmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS yazılım programı (SPSS Inc., sürüm 26.0) ile yapılmıştır. Verilerin grafikleri GraphPad Prism (Graphpad Software Inc., sürüm 7.04) ile hazırlanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir. Normalite dağılımlarında Shapiro-Wilk testi kullanılmıştır. Kan analizleri, doku analizleri ve antropometrik ölçümlerde gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda varyansların homojenitesine göre Tukey post hoc testi kullanılmıştır. NAFLD ve endokanabinoid düzeylerinin diğer parametreler ile ilişkileri pearson korelasyon testi ile analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

Bu araştırma, inülin tüketiminin yüksek yağlı beslenme modeli ile indüklenen nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı üzerine etkilerinin incelendiği 12 haftalık diyetel müdahale çalışmasıdır. Yüksek yağlı beslenme olması ile diyetle inülin ilavesinin karaciğer yağlanması gelişimindeki etkileri incelenmiştir.

Araştırma ortalama ağırlığı 240±30.8 g olan toplam 25 rat ile başlamıştır ve kontrol (K, n=6), kontrol+inülin (Kİ, n=6), yüksek yağlı (YY, n=7) ve yüksek yağlı+inülin (YYİ, n=6) olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. 12 hafta süresince ratların günlük besin tüketimleri, haftalık ağırlıkları ve açlık kan glukoz düzeyleri takip edilmiştir. 12. haftada yüksek yağlı diyetle beslenen grupta yağlı karaciğer gelişimi gözlenmiştir ve araştırma sonlandırılmıştır. Tüm analizler, her grupta 6 rat olmak üzere toplam 24 rat üzerinde değerlendirilmiştir. Araştırmanın sonlandırıldığı 12. haftadan sonra kan numuneleri, karaciğer ve beyin dokuları (prefrontal korteks, PFC) analiz edilmiştir.

3.1. Antropometrik Ölçümler, Besin Tüketimi ve Açlık Kan Glukozu

Araştırmanın başlangıcı ve 12. haftasında ratların vücut ağırlığı (g), nazo anal uzunluğu (cm), Lee obezite indeksi ve açlık kan glukozu (mg/dl) değerleri Çizelge 3.1’de gösterilmektedir.

Araştırma başlangıcında tüm parametrelerde gruplar arasında homojen bir dağılım görülmekte iken araştırmanın 12. haftasında yüksek yağlı diyetle beslenen grubun vücut ağırlığı, Lee obezite indeksi ve açlık kan glukoz düzeyleri diğer gruplardan anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). 12 hafta boyunca yüksek yağlı beslenen grupta Lee obezite indeksi (325 ± 5.45) değerine göre obezite geliştiği görülmüştür. Ratların büyümeleri ile birlikte nazo anal uzunluk ölçülerinin

değerleri artsa da araştırmanın başlangıcında ve sonunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık oluşmamıştır.

Çizelge 3.1. Ratların araştırmanın başlangıcı ve 12. haftasındaki antropometrik ölçümleri ile açlık kan glukoz değerleri

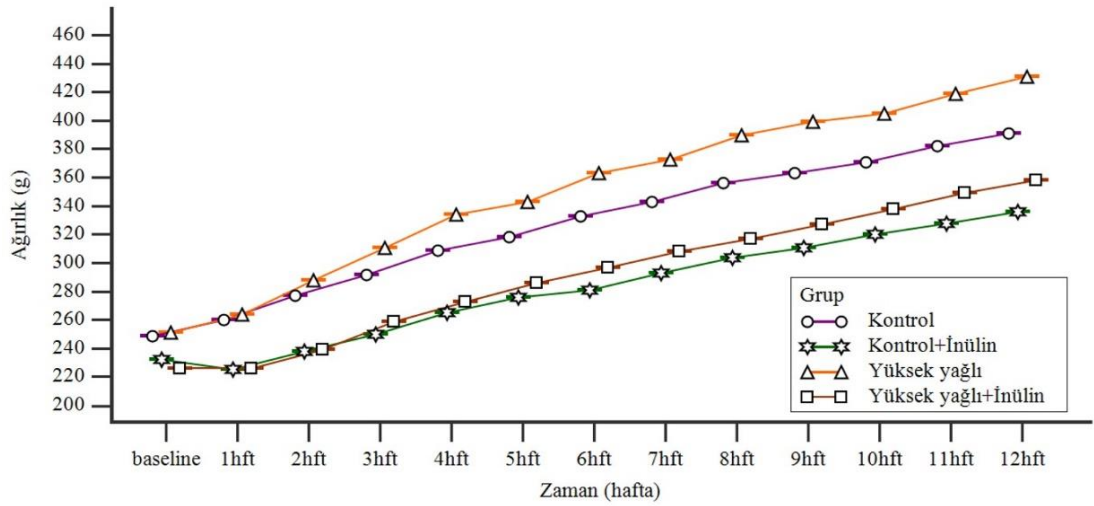
		K	Kİ	YY	YYİ	p
		$\bar{X} \pm SS$	$\bar{X} \pm SS$	$\bar{X} \pm SS$	$\bar{X} \pm SS$	
Vücut ağırlığı (g)	Baseline	249 $\pm$ 44.3	232 $\pm$ 19.6	251 $\pm$ 30.9	226 $\pm$ 22.7	>0.05
	12.hafta	390 $\pm$ 64.5 ^a	336 $\pm$ 20.9 ^a	430 $\pm$ 29.1 ^b	358 $\pm$ 49.3 ^a	0.004
Ağırlık kazanımı (%) [#]		58.1 $\pm$ 11.3 ^a	44.8 $\pm$ 6.54 ^a	73.2 $\pm$ 13.3 ^b	59.4 $\pm$ 7.42 ^a	0.000
Nazo anal uzunluk (cm)	Baseline	20.7 $\pm$ 1.29	20.4 $\pm$ 0.66	20.7 $\pm$ 0.85	20.2 $\pm$ 0.75	>0.05
	12.hafta	23.5 $\pm$ 1.15	23.1 $\pm$ 0.68	23.2 $\pm$ 0.56	23.1 $\pm$ 0.93	>0.05
Lee obezite indeksi	Baseline	302 $\pm$ 0.53	300 $\pm$ 4.33	304 $\pm$ 6.65	301 $\pm$ 3.77	>0.05
	12.hafta	309 $\pm$ 7.59 ^a	300 $\pm$ 7.64 ^a	325 $\pm$ 5.45 ^b	305 $\pm$ 11.3 ^a	0.000
Açlık kan glukozu (mg/dl)	Baseline	82.0 $\pm$ 12.6	76.7 $\pm$ 10.9	79.8 $\pm$ 12.8	87.1 $\pm$ 12.5	>0.05
	12.hafta	94.1 $\pm$ 0.83 ^a	91.5 $\pm$ 2.33 ^a	121 $\pm$ 3.17 ^b	93.8 $\pm$ 1.57 ^a	0.004

K; Kontrol, Kİ; Kontrol+İnülin, YY; Yüksek yağlı, YYİ; Yüksek yağlı+İnülin

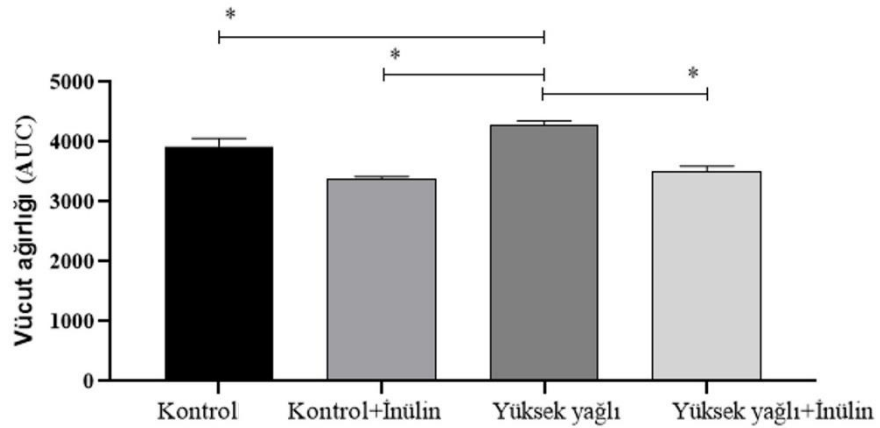
a, b; gruplar arası anlamlı farklılıkları göstermektedir.

[#]Vücut ağırlığı kazanımı doğum sonrası 10. hafta ile 22. hafta arasındaki değişimi ifade etmektedir.

Araştırmanın 12 haftalık müdahale süresi boyunca ortalama ağırlık değişimlerine bakıldığında, YY grubundaki istatistiksel farklılığın 4. haftada başladığı görülmüştür (Şekil 3.1). Ayrıca, ratların 12 hafta boyunca ölçülen ağırlıklarının eğri altında kalan alan (AUC) değerleri Şekil 3.2’de gösterilmektedir. Bu verilere göre 12 haftalık süreçte ağırlık (g) YY grubunda önemli ölçüde artmıştır (K grubuna göre %10.2; Kİ grubuna göre %27.9; YYİ grubuna göre %20.1).



Şekil 3.1. Ratların 12 hafta boyunca haftalık ortalama ağırlık değişimleri



Şekil 3.2. 12 haftalık vücut ağırlığı AUC değerleri

3.2. Besin Tüketimi ve Enerji Alımı

Ratların 12 hafta boyunca günlük besin tüketim miktarı kayıtlarından elde edilen verilere göre hesaplanan günlük tükettikleri ortalama besin miktarı (g/gün) ve enerji alımı miktarı (kkal/gün) Çizelge 3.2’de gösterilmektedir.

Gruplara göre günlük ortalama besin tüketim miktarları, K grubunda 26.2 g, Kİ grubunda 20.5 g, YY grubunda 26.7 g ve YYİ grubunda 18.4 g olarak bulunmuştur. Günlük ortalama enerji alımı miktarlarına bakıldığında, K grubu günde ortalama 101 kkal, Kİ grubu ortalama 79.2 kkal, YY grubu ortalama 127 ve YYİ grubu ortalama 87.1 kkal enerji almıştır.

Çizelge 3.2. Ratların araştırma süresince günlük besin tüketimi ve enerji alımı miktarları

	K	Kİ	YY	YYİ
Besin tüketimi (g/gün)*	26.2	20.5	26.7	18.4
Enerji alımı (kkal/gün)*	101	79.2	127	87.1

*Her kafeste bulunan 6 hayvanın toplam besin tüketiminden hesaplanmıştır.

3.3. Biyokimyasal Parametreler

Araştırmanın 12. haftasında ratlardan alınan kanların biyokimyasal parametrelerinin sonuçları Çizelge 3.3'te gösterilmektedir. Bu parametreler, tam otomatik biyokimya analizatörü ile bakılan Glukoz, LDL, HDL, TG, TK, ALT, AST düzeyleri ve ELISA yöntemi ile bakılan insülin, adiponektin, leptin ve ghrelinlerdir. Diğer gruplar YY grubu ile karşılaştırıldığında, glukoz (mmol/dl), HOMA (mg/μU), TG (mg/dl), AST (U/l) ve leptin (pg/ml) düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

Açlık kan glukozu düzeyleri araştırmanın başlangıcında gruplar arasında benzer bulunmuştur, ancak 12. haftadaki açlık kan glukozu YY grubunda önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur: K grubuna göre %28.3; Kİ grubuna göre %32.1; YYİ grubuna göre %28.7.

HOMA değeri değerlendirildiğinde 4.42 ± 0.37 mg/μU değeri ile sadece YY grubunda insülin direnci gelişimi gözlenmiştir. YY grubunda TG (mg/dl) düzeyinin diğer gruplara göre yaklaşık iki kat daha fazla olduğu görülmüştür. Diğer gruplar ile

daha yüksek düzeylerde bulunsa da bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Açlık leptin düzeyleri YY'de (206 ± 22.1 pg/ml) K (78.3 ± 8.88 pg/ml), Kİ (67.6 ± 14.0 pg/ml) ve YYİ'den (95.5 ± 11.9 pg/ml) anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p=0.000$). Ayrıca leptin düzeylerinin 12. hafta ağırlık ($r=0.741$) ve Lee obezite skoru ile ($r=0.893$) anlamlı olarak ilişkili olduğu görülmüştür (Şekil 3.2). K, Kİ, YY ve YYİ'de açlık ghrelin seviyeleri sırasıyla 605 ± 62.5 pg/ml, 376 ± 68.3 256 pg/ml, 591 ± 40.1 pg/ml ve 452 ± 72.0 pg/ml'dir. İstatistiksel farklılık sadece Kİ ile K - YY grupları arasında anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0.039$).

Çizelge 3.3. Ratların biyokimyasal sonuçları

	K	Kİ	YY	YYİ	p
	$\bar{X} \pm SS$	$\bar{X} \pm SS$	$\bar{X} \pm SS$	$\bar{X} \pm SS$	
Glukoz (mmol/dl)	5.23 ± 0.11^a	5.08 ± 0.31^a	6.71 ± 0.17^b	5.21 ± 0.21^a	0.004
İnsülin (ng/ml)	$1.09 \pm 0.15^{a,b}$	0.83 ± 0.20^a	1.47 ± 0.09^b	$1.08 \pm 0.13^{a,b}$	0.037
HOMA (mg/ μ U)	2.54 ± 0.34^a	1.86 ± 0.43^a	4.42 ± 0.3^b	2.49 ± 0.28^a	0.000
LDL (mg/dl)	47.5 ± 5.33	49.0 ± 4.56	51.4 ± 6.08	46.0 ± 3.06	>0.05
HDL (mg/dl)	$52.0 \pm 2.02^{a,b}$	49.0 ± 1.78^a	60.4 ± 2.62^b	49.1 ± 2.52^a	0.004
TG (mg/dl)	119 ± 15.1^a	89.6 ± 13.8^a	174 ± 7.04^b	78.3 ± 9.02^a	0.020
TK (mg/dl)	$123 \pm 4.23^{a,b}$	94.6 ± 7.45^a	145 ± 10.3^b	92.4 ± 7.25^a	0.000
ALT (mg/dl)	41.1 ± 3.36	43.0 ± 2.73	52.0 ± 3.60	41.3 ± 3.83	>0.05
AST (U/l)	42.2 ± 2.49^a	35.1 ± 3.25^a	58.5 ± 3.9^b	35.3 ± 2.88^a	0.000
Adiponektin (ng/ml)	112 ± 25.5^a	63.7 ± 9.50^b	41.3 ± 9.86^b	49.1 ± 6.25^b	0.006
Leptin (pg/ml)	78.3 ± 8.88^a	67.6 ± 14.0^a	206 ± 22.1^b	95.5 ± 11.9^a	0.000
Ghrelin (pg/ml)	605 ± 62.5^a	376 ± 68.3^b	591 ± 40.1^a	$452 \pm 72.0^{a,b}$	0.039

a, b; gruplar arası anlamlı farklılıkları göstermektedir.

3.4. Doku Analizleri

Araştırmanın sonunda ratlardan alınan karaciğer ve PFC; ağırlık, organ indeksi, histopatolojik, genetik (qPCR) ve kromatografik (LC-MS/MS) sonuçları ile

değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerdeki istatistiksel farklılıklar YY grubu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.4.1. Ratların Organ Ağırlığı ve İndeksi

Ratların organ ağırlık ve indeks sonuçları Çizelge 3.4'te gösterilmektedir. Araştırma sonunda gruplar arasında ortalama beyin ağırlıkları açısından anlamlı bir farklılık bulunmazken karaciğer ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşmuştur ($p<0.05$). Karaciğer ağırlıkları YY grubunda (10.63 ± 0.83 g), Kİ grubuna göre (8.100 ± 0.94 g) ve YYİ grubuna (8.234 ± 1.20 g) göre anlamlı derecede daha yüksek çıkmıştır (sırasıyla %31.2 ve %29.1 daha fazla). Vücut ağırlığına göre hesaplanan karaciğer indeksi ve beyin indeksi incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Çizelge 3.4. Karaciğer ve beyin organlarının ortalama ağırlığı ve ortalama indeksi

	K	Kİ	YY	YYİ	p
	$\bar{X}\pm SS$	$\bar{X}\pm SS$	$\bar{X}\pm SS$	$\bar{X}\pm SS$	
Karaciğer ağırlığı (g)	9.346 ± 1.77^a	8.100 ± 0.94^a	10.63 ± 0.83^b	8.234 ± 1.20^a	0.007
Karaciğer indeksi (%)	2.38 ± 0.11	2.41 ± 0.21	2.48 ± 0.24	2.28 ± 0.25	>0.05
Beyin ağırlığı (g)	1.695 ± 0.19	1.633 ± 0.15	1.739 ± 0.18	1.589 ± 0.16	>0.05
Beyin indeksi (%)	0.439 ± 0.06	0.488 ± 0.06	0.407 ± 0.05	0.442 ± 0.06	>0.05

a, b; gruplar arası anlamlı farklılıkları göstermektedir.

3.4.2. Karaciğer Dokularının Histopatolojik Sonuçları

Doku örneklerinin histopatolojik değerlendirme sonucu elde edilen NAFLD skor sonuçları Çizelge 3.5'te gösterilmiştir. Aktivite skorları ve fibrozis değerlendirmesine ait histopatolojik görünüm Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

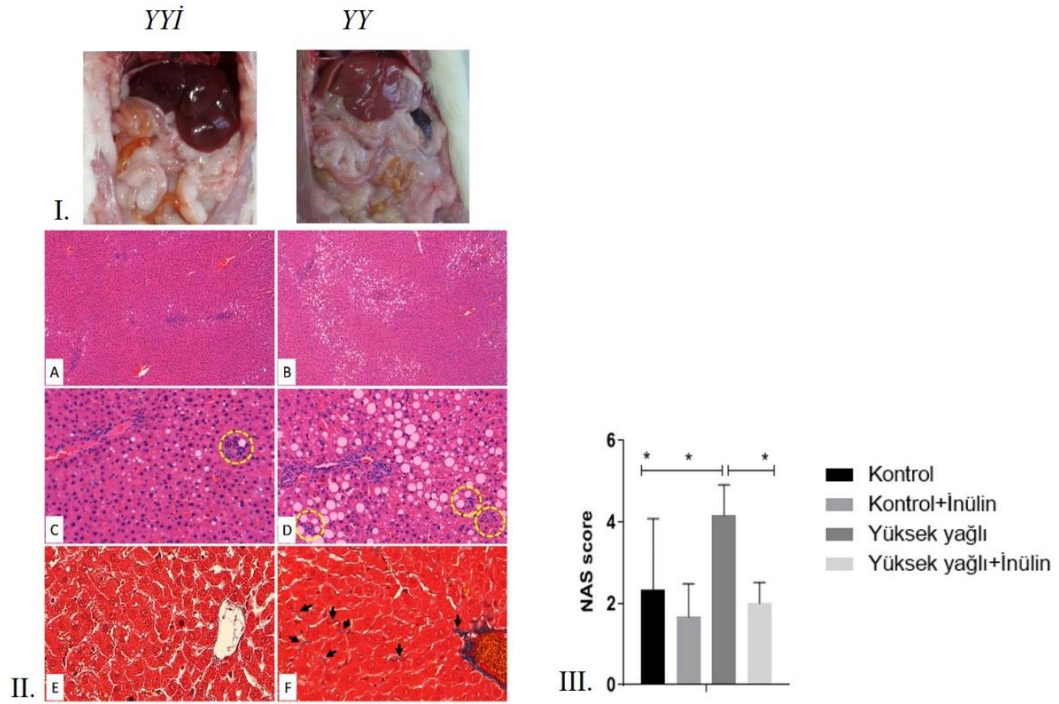
Yüksek yağlı diyetle beslenen grupta mikroveziküler steatoz, makroveziküler steatoz ve lobüler inflamasyon derecelerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Toplam steatoz skoru ve NAS değerleri anlamlı derecede daha yüksektir. Gruplar steatoz skoru açısından karşılaştırıldığında YY ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür (K, 1.33 ± 0.42 ; Kİ, 0.50 ± 0.22 ; YY, 2.66 ± 0.42 ; YYİ, 0.66 ± 0.21). Toplam NAFLD aktivite skoruna (NAS) bakıldığında, YY grubunun toplam skoru (4.16 ± 0.30), K grubunun (2.33 ± 0.71), Kİ grubunun (1.66 ± 0.33) ve YYİ grubunun (2.00 ± 0.51) skorlarından anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Ayrıca YY grubunun tamamında 1a düzeyinde fibrozis geliştiği belirlenmiştir. Hiçbir numunede hepatoselüler balonlaşma görülmemiştir (Şekil 3.3).

Çizelge 3.5. Karaciğer dokularının histopatolojik özellikleri ve grupların histopatolojik skorları

		K	Kİ	YY	YYİ	p
Steatoz	Mikro veziküler	0(<%5)	1	3	-	2
		1(%5-33)	3	3	2	4
		2(%34-66)	2	-	4	-
		3(>%66)	-	-	-	-
	Makro veziküler	0(<%5)	5	6	2	6
		1(%5-33)	1	-	3	-
		2(%34-66)	-	-	1	-
		3(>%66)	-	-	-	-
Steatoz skoru		1.33±0.42 ^a	0.50±0.22 ^a	2.66±0.42 ^b	0.66±0.2 ^a	0.001
Lobüler nekro inflamasyon	0 (Yok)	2	1	-	1	
	1 (<2 odak/20x alan)	2	3	1	2	
	2 (2-4 odak/20x alan)	2	2	5	3	
	3 (>4 odak/20x alan)	-	-	-	-	
Lobüler nekroinflamasyon skoru		1.00±0.36	1.16±0.31	1.50±0.22	1.33±0.34	>0.05
Toplam NAS		2.33±0.71 ^a	1.66±0.33 ^a	4.16±0.3 ^b	2.00±0.51 ^a	0.009

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir.

a, b; gruplar arası anlamlı farklılıkları göstermektedir.



Şekil 3.3. İnülin ilavesinin nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı gelişimi üzerine etkileri

I. Karaciğer görünüşleri. II. Hepatik boyama ile mikroskopik görüntüler. III. NAS. Veriler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir.

* $p < 0.05$. NAS, NAFLD aktivite skoru, YY; Yüksek yağlı, YYİ; Yüksek yağlı+İnulin. Steatoz; A. Grade 1, B. Grade 2 (H&E, x100), Lobüler inflamasyon; C. Grade 1; tek inflamatuvar odak, D. Grade 2; üç inflamatuvar odak (H&E, x200), Fibrozis; E. Yok, F. Hafif şiddette zon 3 sinüzoidal fibrozis (Masson Trikrom, x578).

3.4.3. Dokularda qPCR Analizleri

Ratların karaciğer ve PFC dokularındaki *Cnr1*, *Cnr2*, *Trpv1*, *Adrb3*, *Pnpla3*, *Gnas* ve *Adcy1* genlerinin ekspresyon düzeyleri Çizelge 3.6'da gösterilmektedir. Ayrıca bu genlerin PFC ve karaciğer dokularındaki ekspresyon düzeylerinin gruplar arasındaki farklılıkları Şekil 3.4'te ve Şekil 3.5'te gösterilmektedir.

Prefrontal korteks dokusunda; *Cnr1*, *Adrb3* ve *Adcy1* ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *Cnr1*; YY grubuna göre (0.223 ± 0.035) ve YYİ grubuna göre (0.134 ± 0.067) anlamlı derecede en yüksek

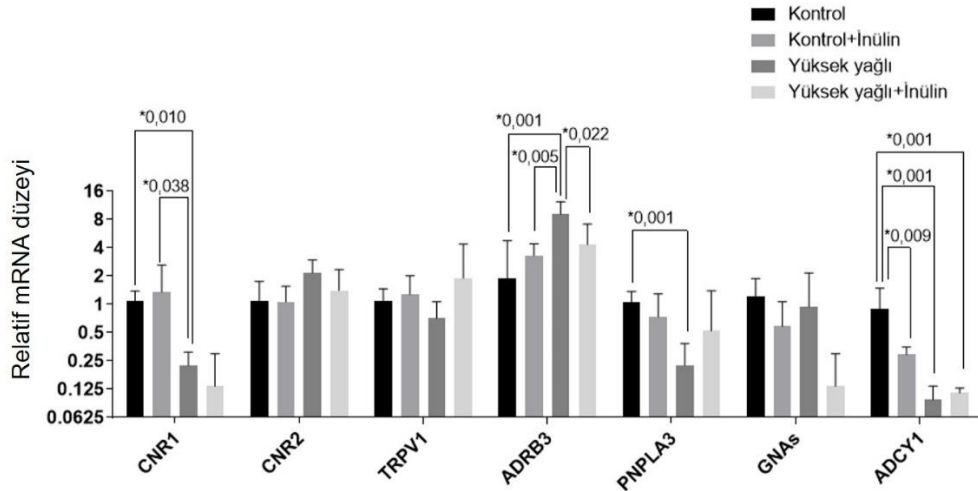
düzeyde Kİ grubunda (1.351 ± 0.525) eksprese edilmiştir (Şekil 3.4). Ayrıca *Cnr2* geni en yüksek miktarda YY grubunda eksprese edilmiş olsa da bu durum gruplar arasında anlamlı bulunmamıştır. *Adrb3* geni; YY grupta (9.186 ± 1.337) K grubu (1.907 ± 1.169), Kİ grubu (3.317 ± 0.452) ve YYİ grubu (4.336 ± 1.155) ile karşılaştırıldığında daha yüksek düzeyde eksprese olmuştur. *Adcy1* geni; YY grubunda 0.096 ± 0.015 ile en düşük düzeyde eksprese edilirken K grubunda 0.901 ± 0.237 düzeyi ile diğer gruplardan istatistiksel olarak daha yüksek miktarda eksprese edilmiştir.

Karaciğer dokusunda; *Cnr1*, *Trpv1*, *Pnpla3*, *Gnas* ve *Adcy1* gen ekspresyonları gruplar arasında anlamlı farklılıklar göstermiştir. *Cnr1* geni; YY grubunda 9.789 ± 3.136 düzeyinde eksprese edilmiştir ve bu diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu ekspresyon miktarı K grubunda 1.432 ± 0.584 , en düşük olarak Kİ grubunda 0.550 ± 0.238 ve YYİ grubunda 3.053 ± 0.982 düzeyindedir. Ayrıca *Cnr2* geni en yüksek miktarda YY grubunda eksprese edilmiş olsa da bu durum gruplar arasında anlamlı bulunmamıştır. *Trpv1* geni; YY grubunda (1.921 ± 0.108) YYİ grubuna göre (2.930 ± 0.645) daha düşük düzeyde eksprese edilmiştir ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. K (1.506 ± 0.073) ve Kİ (1.267 ± 0.075) grupları ile YYİ grubu arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur. *Pnpla3* geni; 35.18 ± 9.472 ile en yüksek düzeyde YY grubunda eksprese edilmiştir ve bu yükseklik K grubu (1.186 ± 0.222), Kİ grubu (0.466 ± 0.180) ve YYİ grubu (12.90 ± 5.752) ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *Gnas* geni; K grubu (0.794 ± 0.216) inülin eklenen Kİ grubundan (0.101 ± 0.014) ve YY grubu (0.415 ± 0.077) inülin eklenen YYİ grubundan (0.397 ± 0.138) daha yüksek düzeyde eksprese edilmişse de sadece K ve Kİ grupları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *Adcy1* geni; en yüksek düzeyde YY grubunda (2.094 ± 0.412) eksprese edilmiştir ve bu durum sadece Kİ grubu (0.184 ± 0.053) ile istatistiksel farklılık göstermiştir.

Çizelge 3.6. Karaciğer ve beyin dokularında gen ekspresyon düzeyleri

		K	Kİ	YY	YYİ	p
		$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	$\bar{X} \pm \text{SEM}$	
PFC	<i>Cnr1</i>	1.086±0.123	1.351±0.525	0.223±0.035	0.134±0.067	0.009
	<i>Cnr2</i>	1.098±0.271	1.065±0.201	2.157±0.329	1.410±0.382	>0.05
	<i>Trpv1</i>	1.099±0.149	1.281±0.300	0.711±0.143	1.901±1.022	>0.05
	<i>Adrb3</i>	1.907±1.169	3.317±0.452	9.186±1.337	4.336±1.155	0.000
	<i>Pnpla3</i>	1.046±0.132	0.738±0.226	0.224±0.064	0.522±0.356	>0.05
	<i>Gnas</i>	1.199±0.282	0.582±0.197	0.948±0.497	0.134±0.067	>0.05
	<i>Adcy1</i>	0.901±0.237	0.292±0.024	0.096±0.015	0.114±0.006	0.000
Karaciğer	<i>Cnr1</i>	1.432±0.584	0.550±0.238	9.789±3.136	3.053±0.982	0.004
	<i>Cnr2</i>	1.680±0.836	0.300±0.145	1.899±0.577	0.736±0.098	>0.05
	<i>Trpv1</i>	1.506±0.073	1.267±0.075	1.921±0.108	2.930±0.645	0.010
	<i>Adrb3</i>	0.951±0.541	0.907±0.403	7.622±4.349	4.951±1.647	>0.05
	<i>Pnpla3</i>	1.186±0.222	0.466±0.180	35.18±9.472	12.90±5.752	0.000
	<i>Gnas</i>	0.794±0.216	0.101±0.014	0.415±0.077	0.397±0.138	0.014
	<i>Adcy1</i>	1.186±0.413	0.184±0.053	2.094±0.412	1.304±0.379	0.009

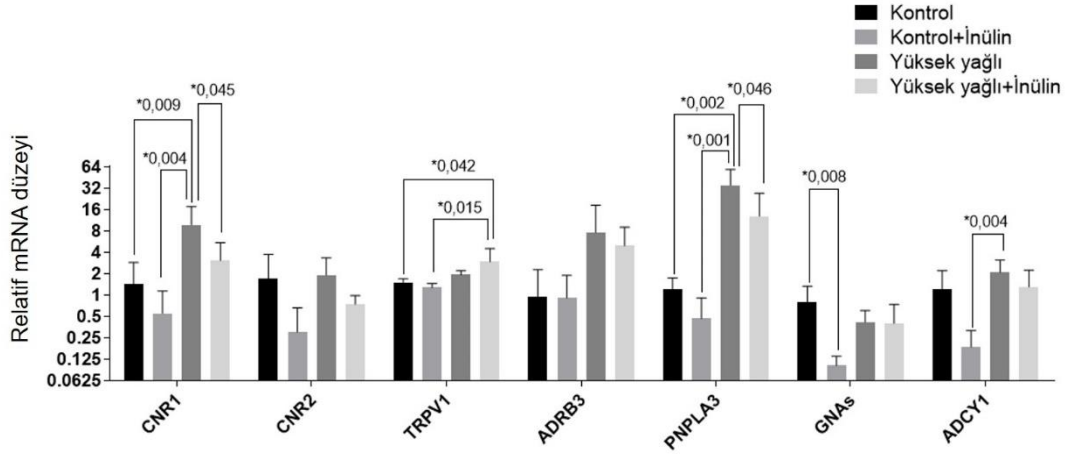
PFC, Prefrontal korteks; SEM, Standart hata.



Şekil 3.4. Prefrontal korteks dokularında genlerin ekspresyon düzeyleri.

Cnr1; Kanabinoid reseptör1, *Cnr2*; Kanabinoid reseptör 2, *Trpv1*; Transient reseptör potansiyel vanilloid 1, *Adrb3*; β 3-adrenerjik reseptör, *Adcy1*; Adenilat siklaz 1, *Pnpla3*; Patatin benzeri fosfolipaz 3, *Gnas*; G-protein uyarıcı subunit α için gen kodu.

*Gruplar arası istatistiksel farklılıkları göstermektedir.



Şekil 3.5. Karaciğer dokularında genlerin ekspresyon düzeyleri.

Cnr1; Kanabinoid reseptör 1, *Cnr2*; Kanabinoid reseptör 2, *Trpv1*; Transient reseptör potansiyel vanilloid 1, *Adrb33*; β 3-adrenerjik reseptör, *Adcy1*; Adenilat siklaz 1, *Pnpla3*; Patatin benzeri fosfolipaz 3, *Gnas*; G-protein uyarıcı subunit α için gen kodu.

*Gruplar arası istatistiksel farklılıkları göstermektedir.

3.4.4. Dokularda LC-MS/MS Analizleri

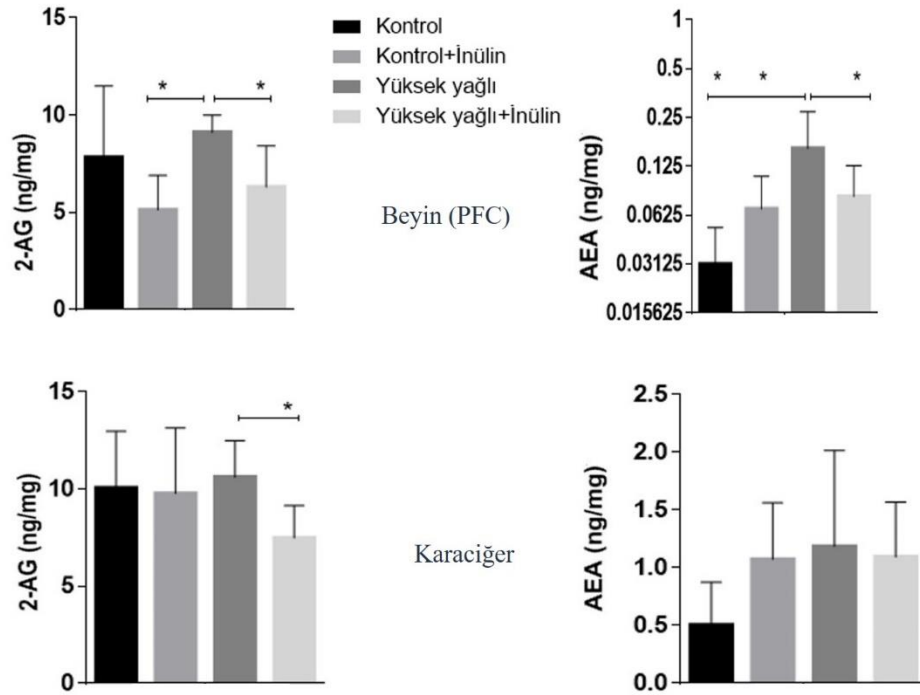
Dokulardaki endokanabinoid analiz sonuçları Çizelge 3.7’de ve Şekil 3.6’da gösterilmektedir. Dokularda miktar tayini yapılan AEA endokanabinoid düzeyleri YY grubunun karaciğer dokularında daha yüksek miktarlarda saptansa da bu yükseklik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.6). 2-AG düzeyleri YYİ grubuna göre YY grubunda anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 3.6).

Prefrontal korteks dokularındaki AEA düzeyi YY grubunda (0.161 ± 0.044 ng/mg), K grubuna (0.031 ± 0.007 ng/mg), Kİ grubuna (0.068 ± 0.016 ng/mg) ve YYİ grubuna (0.081 ± 0.018 ng/mg) göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Prefrontal korteks dokularındaki 2-AG düzeyi gruplara göre sırasıyla 7.816 ± 1.503 ng/mg, 5.132 ± 0.725 ng/mg, 9.119 ± 0.362 ng/mg ve 6.304 ± 0.861 ng/mg olarak bulunmuştur. 2-AG düzeyinin diğer gruplardaki miktarları YY grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 3.6)

Çizelge 3.7. Dokulardaki LC-MS/MS analizleri ile ölçülen Anandamid ve 2-Araşidonilgliserol düzeyleri

		K	Kİ	YY	YYİ	p
		$\bar{X} \pm SS$	$\bar{X} \pm SS$	$\bar{X} \pm SS$	$\bar{X} \pm SS$	
Karaciğer	AEA (ng/mg)	0.504±0.166	1.074±0.199	1.187±0.338	1.094±0.194	>0.05
	2-AG (ng/mg)	10.05±1.307	9.783±1.373	10.62±0.764	7.94±0.677	0.046
PFC	AEA (ng/mg)	0.031±0.007	0.068±0.016	0.161±0.044	0.081±0.018	0.022
	2-AG (ng/mg)	7.816±1.503	5.132±0.725	9.119±0.362	6.304±0.861	0.041

2-AG; 2-Araşidonilgliserol, AEA; Anandamid, PFC; Prefrontal korteks.



Şekil 3.6. Prefrontal korteks ve karaciğerde LC-MS/MS analizi ile ölçülen Anandamid ve 2-Araşidonilgliserol düzeyleri.

* Tukey post hoc $p < 0.05$.

3.4.5. Elde Edilen Verilerin Korelasyon Analizleri

NAFLD ile ilişkili olarak toplam NAFLD skoru, toplam steatoz ve lobüler inflamasyon skorları ile antropometrik ölçümler, gen ekspresyon düzeyleri, açlık hormon düzeyleri ve adipokinler arasındaki ilişki incelenmiştir. Araştırmadan elde edilen verilerin korelasyon analizleri Çizelge 3.8’de gösterilmektedir.

Toplam steatoz; ağırlık ($r=0.786$), Lee indeksi ($r=0.753$), PFC *Cnr2* ($r=0.654$), PFC *Adrb3* ($r=0.612$), karaciğer *Cnr1* ($r=0.781$), karaciğer *Cnr2* ($r=0.559$), karaciğer *Adrb3* ($r=0.535$), karaciğer *Pnpla3* ($r=0.730$), karaciğer *Adcy1* ($r=0.764$), ghrelin ($r=0.633$) ve leptin ($r=0.773$) ile pozitif yönlü korelasyon göstermiştir ($p<0.05$).

Lobüler inflamasyon; ağırlık ($r=0.549$), Lee indeksi ($r=0.510$), PFC *Cnr2* ($r=0.526$) ile pozitif korelasyon gösterirken adiponektin ($r=-0.588$) ile anlamlı derecede negatif korelasyon göstermiştir ($p<0.05$).

Toplam NAS; ağırlık ($r=0.856$), Lee indeksi ($r=0.785$), PFC *Cnr2* ($r=0.712$), PFC *Adrb3* ($r=0.595$), karaciğer *Cnr1* ($r=0.692$), karaciğer *Adrb3* ($r=0.433$), karaciğer *Pnpla3* ($r=0.658$), karaciğer *Gnas* ($r=0.452$), karaciğer *Adcy1* ($r=0.784$), ghrelin ($r=0.420$), leptin ($r=0.816$) ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca adiponektin ($r=-0.558$) ile orta şiddetle negatif korelasyon göstermiştir ($p<0.05$).

Çizelge 3.8. Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı ile antropometrik ölçümler, gen ekspresyon düzeyleri, kan açlık hormonları ve kan adipokinleri arasındaki korelasyon

		Toplam Steatoz		Lobüler İnflamasyon		Toplam NAS	
		r	p	r	p	r	p
Antropometrik ölçümler	Ağırlık	0.786	0.000	0.508	0.011	0.856	0.000
	Lee indeksi	0.753	0.000	0.415	0.044	0.785	0.000
Gen ekspresyonları	PFC	<i>Cnr1</i>	0.108	0.617	0.256	0.228	>0.05
		<i>Cnr2</i>	0.654	0.001	0.423	0.039	0.712
		<i>Trpv1</i>	-.315	0.133	-.041	0.848	>0.05
		<i>Adrb3</i>	0.612	0.001	0.250	0.238	0.595
		<i>Pnpla3</i>	-.157	0.462	0.244	0.251	>0.05
		<i>Gnas</i>	0.359	0.085	0.133	0.537	>0.05
		<i>Adcy1</i>	0.036	0.866	-.283	0.180	>0.05
		<i>Cnr1</i>	0.781	0.000	0.182	0.395	0.692
	Karaciğer	<i>Cnr2</i>	0.559	0.004	0.073	0.735	>0.05
		<i>Trpv1</i>	-.310	0.141	-.252	0.236	>0.05
		<i>Adrb3</i>	0.535	0.007	0.314	0.848	0.433
		<i>Pnpla3</i>	0.730	0.000	0.193	0.366	0.658
		<i>Gnas</i>	0.399	0.053	0.293	0.164	0.452
		<i>Adcy1</i>	0.764	0.000	0.397	0.055	0.784
		<i>Adcy1</i>	0.764	0.000	0.397	0.055	0.784
Açlık hormonları	Ghrelin	0.633	0.001	0.139	0.516	0.420	0.041
Adipokinler	Leptin	0.773	0.000	0.331	0.114	0.759	0.000
	Adiponektin	-.350	0.094	-.588	0.002	-.558	0.004

Pearson korelasyon testi. NAS; NAFLD aktivite skoru, AEA; Anandamid, 2-AG; 2-Araşidonilgliserol, *Cnr1*; Kanabinoid reseptör1, *Cnr2*; Kanabinoid reseptör 2, *Trpv1*; Transient reseptör potansiyel vanilloid 1, *Adrb3*; β 3-adrenerjik reseptör, *Adcy1*; Adenilat siklaz 1, *Pnpla3*; Patatin benzeri fosfolipaz 3, *Gnas*; G-protein uyarıcı subunit α için gen kodu, PFC; Prefrontal korteks.

Endokanabinoid düzeyleri ile antropometrik ölçümler, gen ekspresyon düzeyleri, kan açlık hormonları ve adipokinler arasındaki korelasyon Çizelge 3.9’da gösterilmektedir. PFC AEA düzeyi; Ağırlık ($r=0.570$), Lee indeksi ($r=0.651$), PFC *Cnr2* ($r=0.736$), PFC *Adrb3* ($r=0.670$), Leptin ($r=0.816$) ile pozitif korelasyon ve Adiponektin ($r=-.572$) ile negatif korelasyon göstermiştir. PFC 2-AG düzeyi; Ağırlık

($r=0.748$), Lee indeksi ($r=0.715$), PFC *Cnr2* (0.621), PFC *Gnas* ($r=0.521$) ve Leptin ($r=0.563$) ile pozitif korelasyon göstermiştir.

Karaciğer AEA düzeyi; Ağırlık ($r=0.622$), Lee indeksi ($r=0.444$) ve Leptin (0.464) ile pozitif korelasyon ve Karaciğer *Trpv1* ($r=-.594$) ile negatif korelasyon göstermiştir. Karaciğer 2-AG düzeyi; Karaciğer *Cnr1* ($r=0.601$), Karaciğer *Adrb3* ($r=0.590$), Karaciğer *Pnpla3* ($r=0.589$) ve Karaciğer *Adcy1* ($r=0.437$) ile pozitif korelasyon Adiponektin ($r=-.600$) negatif korelasyon göstermiştir.

Çizelge 3.9. Endokanabinoid düzeyleri ile antropometrik ölçümler, gen ekspresyon düzeyleri, kan açlık hormonları ve adipokinler arasındaki korelasyon

		PFC AEA (ng/mg)		PFC 2-AG (ng/mg)		Karaciğer AEA (ng/mg)		Karaciğer 2-AG (ng/mg)	
		r	p	r	p	r	p	r	p
Antropometrik ölçümler	Ağırlık	0.570	0.004	0.748	0.000	0.622	0.001	0.395	>0.05
	Lee indeksi	0.651	0.001	0.715	0.000	0.444	0.030	0.353	>0.05
Gen ekspresyonları*	<i>Cnr1</i>	0.069	0.747	0.068	0.750	0.401	0.052	0.601	0.002
	<i>Cnr2</i>	0.736	0.000	0.621	0.000	0.365	0.080	0.171	>0.05
	<i>Trpv1</i>	-.079	0.712	-.367	0.078	-.594	0.002	-.309	>0.05
	<i>Adrb3</i>	0.670	0.000	0.368	0.069	0.293	0.165	0.590	0.002
	<i>Pnpla3</i>	-.161	0.452	-.020	0.927	0.319	0.129	0.589	0.002
	<i>Gnas</i>	0.144	0.503	0.521	0.007	0.331	0.114	0.011	>0.05
	<i>Adcy1</i>	0.341	0.103	-.163	0.446	0.335	0.110	0.437	0.033
Açlık hormonları	Ghrelin	0.223	0.295	0.370	0.075	0.247	0.244	0.057	>0.05
Adipokinler	Leptin	0.816	0.000	0.563	0.004	0.464	0.022	0.509	0.011
	Adiponektin	-.572	0.004	-.383	0.065	-.304	0.148	-.600	0.002

Pearson korelasyon testi. AEA; Anandamid, 2-AG; 2-Araşidonilgliserol, *Cnr1*; Kanabinoid reseptör1, *Cnr2*; Kanabinoid reseptör 2, *Trpv1*; Transient reseptör potansiyel vanilloid 1, *Adrb3*; β 3-adrenerjik reseptör, *Adcy1*; Adenilat siklaz 1, *Pnpla3*; Patatin benzeri fosfolipaz 3, *Gnas*; G-protein uyarıcı subunit α için gen kodu, PFC; Prefrontal korteks.

*Beyin ve karaciğer dokularına göre ayrı ayrı hesaplanmıştır.

4. TARTIŞMA

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) karaciğerde aşırı miktarda yağ birikimi ile karakterizedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaklaşık %25-30 prevalansa sahip önemli bir halk sağlığı sorunudur. NAFLD'nin 2030 yılı itibariyle tüm dünyada karaciğer transplantasyonlarının temel nedeni olacağı düşünülmektedir (Kismet ve ark., 2018). Bu hastalığın seyri çeşitli evrelerden oluşmaktadır. Nonalkolik yağlı karaciğer, hastalığın seyrinde ilk evredir ve obezite, Tip 2 diyabet, dislipidemi, metabolik sendrom ve insülin direnci ile karakterizedir. Erken tedavi edilmediğinde hastalığın seyri inflamasyon ve fibrozis gelişimi ile birlikte nonalkolik steatohepatit (NASH) ve siroza doğru ilerlemektedir. Aşırı enerji alımı ve sedanter yaşam tarzı NAFLD gelişimi açısından önemli risk faktörleridir. Özellikle yüksek yağlı ve/veya yüksek karbonhidratlı diyetler adipoz doku ve karaciğer fonksiyonları üzerinde doğrudan etkilidir. Batı tarzı beslenme şeklinde yer alan bu diyetlerin etkilerinin başında insülin direnci vardır ve NAFLD hastalığının seyrinde oldukça önemlidir. Özellikle yüksek yağlı diyetler ile insülin direnci ve hepatik inflamasyon gelişimi arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (Liu ve ark., 2016). Diyet örüntülerinde yapılan modifikasyonların insülin direnci başta olmak üzere NAFLD'nin birçok belirtisinde önemli ölçüde iyileşme sağladığı belirlenmiştir (Musso ve ark., 2003). Araştırmadan elde edilen bulguların değerlendirilmesi bu çalışmanın hipotezi doğrultusunda belirlenen primer ve sekonder amaca göre iki kısımdan oluşmaktadır. Birinci kısımda yüksek yağlı diyetle inülin ilave edilmesinin besin tüketimi, ağırlık kazanımı ve NAFLD gelişimi için önemli bir risk faktörü olan obezite gelişimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Bu on iki haftalık diyet müdahale çalışması, inülin takviyesinin iştah uyarıcı hormonlar ve ağırlık kazanımı üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Araştırma sonucunda diyetle inülin ilavesinin besin tüketimini azalttığı (Çizelge 3.2) ve ağırlık artışı önlediği (Çizelge 3.1, Şekil 3.1, Şekil 3.2) sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçların leptin düzeyi ile ilişkili olduğu görülmüştür ve bu koruyucu etkilerin, iştahı, enerji metabolizmasını ve besin tüketimini düzenleyen endokannabinoid ve gen ekspresyon

düzeylerinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. Araştırma sonucunda inülin ilavesinin, PFC'de AEA ve 2-AG düzeylerini azaltarak (Çizelge 3.7, Şekil 3.6), *Cnr1*, *Adrb3* ve *Adyc1* gen ekspresyonlarını baskılayarak (Çizelge 3.6, Şekil 3.4) ve kandaki leptin ve ghrelin düzeylerini azaltarak (Çizelge 3.3) obeziteyi önleyebildiği gözlenmiştir.

Obezite hepatik steatoza neden olması ile NAFLD gelişimi açısından önemli bir risk faktörüdür (Fabbrini ve ark., 2010). İnülin ilavesinin olumlu etkilerinden birisi besin tüketimini azaltmak ve ağırlık kaybını sağlamasıdır. Araştırma sonucunda diyetlere inülin eklenmesinin besin tüketimini K'da %21.8 ve YY'de %31.1 azalttığı, ağırlık kazanımını K'da %22.9 ve YY'de %18.9 azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca, günlük ortalama enerji alımının KI'de (K'ya kıyasla) %21.6 ve YYI'de (YY'ye kıyasla) %31.4 azaltığı görülmüştür. Bu sonuçlar Lee obezite indeksi değeri ile de paraleldir (Çizelge 3.1). Sonuç olarak diyetlere inülin ilave edilmesi ile ağırlık kazanımının ve obezite gelişiminin önüne geçilmiştir. Yapılan bir çalışmada, prediyabeti olan bireylerin diyetine 9 hafta boyunca 30 g/gün inülin ilave edilmesi ile bireylerin vücut ağırlığında yaklaşık %5'lik bir kayıp gerçekleşmiştir (Guess ve ark., 2015). Avrupa Karaciğer Araştırmaları Derneği verilerine göre %7-10 düzeyinde ağırlık kaybı sağlayacak yaşam tarzı önerilerinin NAFLD tedavisinin temelinde önemli olduğu belirtilmiştir (European Association for the Study of the Liver, 2016). Daha önceki çalışma sonuçlarına paralel olarak (Cani ve ark., 2004; Delzenne ve ark., 2005; Salmean, 2017), araştırmadan elde edilen bulgular, inülinin besin tüketimi ve enerji alımı üzerindeki etkisine iştah modülasyonunun aracılık ettiğini göstermektedir. Tokluk regülasyonu, inülin gibi diyet lifi alımından kaynaklanan ağırlık artışını önlemenin potansiyel bir mekanizması olabileceği düşünülmektedir (Harrold ve ark., 2013). Aynı zamanda toplam steatoz, lobüler inflamasyon ve NAS değeri ağırlık ve Lee obezite indeksi ile pozitif ilişkili bulunmuştur (Çizelge 3.8). Bu durum beyin AEA, beyin 2-AG ve karaciğer AEA düzeyleri ile de pozitif ilişkilidir (Çizelge 3.9). Sonuç olarak inülinin endokanabinoid sistem aracılığı ile obezite gelişimini önleyici etkileri ortaya konmuştur.

Bu on iki haftalık diyet müdahale çalışması inülin ilavesinin iştah hormonları ve ağırlık kazanımı üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Yüksek yağlı diyetle inülin ilavesinin, PFC'de endokannabinoid yolunu baskılayarak ağırlık kazanımını ve obeziteyi önlediği sonucuna ulaşılmıştır. Leptin ve ghrelin düzeyleri ile de ilişkili olan bu önleyici etkilerin PFC'deki endokannabinoid düzeyleri ile iştah, enerji metabolizması ve besin alımı üzerinde etkili olan genlerin ekspresyon düzeylerinin etkilenmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada, yüksek yağlı diyetle beslenen wistar ratlarda inülinin PFC'de AEA ve 2-AG düzeylerini düşürdüğü, *Cnr1*, *Adrb3* ve *Adcy1* gen ekspresyonlarını baskıladığı ve serumda açlık leptin ve ghrelin düzeylerini azalttığı görülmüştür (Çizelge 3.3). Çalışmadan elde edilen sonuçlar inülinin PFC'deki *Trpv1*'i uyardığını da göstermektedir (Çizelge 3.6).

Leptin ve ghrelin, enerji dengesi üzerinde önemli etkisi olduğu kabul edilen iki hormondur (Klok ve ark., 2007). Bir çalışmada, yüksek yağlı bir diyet modelinde endokannabinoid reseptörlerinin bloke edilmesinin dolaşımdaki leptin düzeyini önemli ölçüde azalttığı ve leptin direncinin önlenebildiği gözlenmiştir (Tam ve ark., 2017). Balsevich ve ark., (2018) akut leptin uygulamasının hipotalamusta AEA düzeyini azalttığı, ancak 2-AG düzeyini etkilemediği sonucuna ulaşmıştır (Balsevich ve ark., 2018). Di Marzo ve ark., (2001) hipotalamustaki endokannabinoidlerin besin tüketiminin sürdürülmesi için leptin tarafından düzenlenen nöral düzenlenmesinde yer alarak *Cnr1* reseptörlerini aktive edebileceğini göstermiştir (Di Marzo ve ark., 2001). Bu çalışmada artmış serum leptin düzeyinin PFC'de EKS aktivasyonuna neden olduğu düşünülmüştür. Yüksek yağlı diyetle inülin ilavesi ile leptin düzeylerinin düştüğü gözlenmiştir ve leptin direncinin önlenebileceği düşünülmüştür. Ayrıca inülin ilave edilen gruplarda besin tüketiminin de azaldığı görülmüştür. Bir çalışmada ventromedial nöronlardaki *Cnr1* reseptörlerinin organizmayı diyet değişikliğine uyarlayan moleküler bir geçiş sağladığı sonucuna ulaşılmıştır (Cardinal ve ark., 2014). Bu sonuçların yeterliliği için leptin direnci ve PFC'deki *Cnr1* arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ayrıca, biyokimyasal analizler, diyetle eklenen inülinin, K ve YY grubuna kıyasla Kİ grubunda ghrelin düzeyini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Çizelge

3.3). Satta ve ark. (2018) YY diyet ile indüklenen tıknırcasına yeme davranışında YY diyetin PFC'de *Cnr1* reseptör yoğunluğunu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Ayrıca yüksek kısıtlı ve düşük kısıtlı gruplarda plazma leptin düzeylerinde kontrole göre fark olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Ancak bu gruplarda beklenen yükselmenin aksine ghrelin düzeyinin düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, kan örneklerinin diyetle 2 saatlik erişimden hemen sonra toplandığı ve düşük düzeyin bunun bir sonucu olabileceği düşünülmüştür (Satta ve ark., 2018). Parnell ve Reimer, prebiyotik takviyesinin besin tüketimini ve leptin düzeylerini azalttığını göstermiş ve oligofruktoz grubunda gözlenen düşük leptin düzeyinin adipozitedeki azalmayı desteklediği sonucuna varılmıştır (Parnell ve Reimer, 2009). Araştırmamızda, leptin düzeyi ile Lee obezite skorları arasında güçlü bir korelasyon olduğu görülmüştür ($r=0.893$). Ayrıca yüksek yağlı diyetle indüklenen obezitesi olan ratların, önemli ölçüde daha yüksek leptin düzeyine sahip olduğu görülmüştür. İnülin ilave edilmesi ile leptin düzeyleri anlamlı derecede düşmüştür. İnülinin besin tüketimini azaltarak obeziteyi önleyebileceğini ve bunun sonucunda dolaşımdaki leptin düzeyinin azalmasına neden olabileceği sonucuna varılabilir. İnülin ilave edilen YY diyetin adipoziteyi önleyerek daha düşük leptin düzeyine yol açtığı düşünülebilir. Drew ve ark. (2018), leptin düzeyinin, YY diyet ile beslenen farelerde önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ve bu yüksekliğin doğrudan adipozite ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Drew ve ark., 2018).

Bu çalışmada YY grubunda leptin düzeyi diğer gruplar ile kıyaslandığında (K ve Kİ grubuna göre yaklaşık 3 kat, YYİ grubuna göre yaklaşık 2 kat yüksek) anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Yapılan bir çalışmada, 11 hafta yüksek yağlı diyet ile beslenmenin ratlarda hiperleptinemi ve hipoghrelinemiye neden olduğu bulunmuştur (Handjieva-Darlenska ve Boyadjieva, 2009). Bu durum yüksek yağlı diyet ile indüklenen obezite gelişiminde sıklıkla görülen leptin direnci ile ilişkilendirilebilir (El-Haschimi ve ark., 2000). Zhao ve ark. (2020), yüksek yağlı diyetle indüklenen obezite gelişimi sağladıkları deney hayvanlarında leptin direnci gözlemlemişlerdir. Leptin baskılanması ile yüksek yağlı beslenme olmasına rağmen NAFLD ve fibrozis gelişiminin önlenilebileceği sonucuna ulaşmışlardır (Zhao ve ark., 2020). Bu çalışmada YYİ grubunda YY grubuna kıyasla leptin düzeyinin anlamlı

derecede daha düşük olduğu görölmüştür. Ayrıca leptin düzeyi ile toplam steatoz skoru ve NAS değeri yüksek derecede pozitif korelasyon göstermiştir. Normalde anti-steatotik bir hormon olan leptin, lipidlerin karaciğerde birikmesini önlemekte ve mobilizasyonunu arttırmaktadır. Dolayısı ile NAFLD gelişiminde yüksek olan leptin düzeyinin leptin direnci ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir (Martínez-Uña ve ark., 2020). Yapılan bir çalışmada yüksek yağlı beslenme modelinde kanabinoid reseptörlerinin bloke edilmesi ile dolaşımdaki leptin düzeyinin de anlamlı derecede düştüğü ve leptin direncinin önlenemediği görölmüştür (Tam ve ark., 2017).

Ghrelin düzeyi standart diyetle beslenen K grubunda Kİ grubuna göre, anlamlı derecede NAFLD gelişimi görülen YY grubunda da YYİ grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum ratların günlük aldıkları enerji miktarları ile paralellik göstermiştir. Bununla birlikte bu çalışmada ghrelin konsantrasyonu toplam steatoz ve NAS değerleri ile pozitif bir korelasyon gösterse de bu durum hiçbir genetik ekspresyon düzeyi ile ilişkilendirilememiştir. Ayrıca dokulardaki endokanabinoid düzeyleri ile de bir ilişki bulunamamıştır. Bu durumdan dolayı ghrelinin bağımsız parametre olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür. Ghrelin, açillenmiş ve açillenmemiş ghrelin olarak iki formda bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, 13 hafta yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda obezite gelişimi gözlenmiştir. Yüksek yağlı diyet ve kontrol gruplarında ghrelin düzeyi benzer olsa da açillenmemiş ghrelin konsantrasyonları farklılık göstermiştir (François ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada, plazma insülin düzeyi ve HOMA-IR değeri açillenmiş ghrelin ile pozitif korelasyon açillenmemiş ghrelin ile negatif korelasyon göstermiştir (Barazzoni ve ark., 2006).

Eneji içeriği yoğun besinlerin sürekli ve aşırı tüketiminin ağırlık kazanımına ve obeziteye neden olabileceği ve bu durumun PFC fonksiyonları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Lowe ve ark., 2019). Güncel bir çalışmada, lezzetli besinlere uzun süre maruz kalmanın, uzun süreli hiperfaji ve obez bir fenotip ile sonuçlandığını göstermiştir. PFC'de kanabinoid gen ekspresyonunda veya endokanabinoid düzeylerinde herhangi bir farklılık görölmese de nükleus akumbens bölgesinde görölmüştür (Bourdy ve ark., 2021). Başka bir çalışmada, 12 haftalık YY'nin dışı

ratların PFC bölgesinde *Cnr1* reseptör fonksiyonunda artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır (Rojo ve ark., 2013). Bu çalışmada 12 haftalık YY'nin PFC'de yüksek AEA ve 2-AG düzeyi ile sonuçlandığını ve aynı diyetle inülin ilave edilmesi ile bu düzeylerin daha düşük olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.7, Şekil 3.6). İnülin ilavesinin PFC bölgesindeki etkilerini inceleyen iki çalışmada inülin ilavesi sonucu gut mikrobiyotasındaki değişiklikler ile nöropsikoloji ve nöroinflamasyon arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. İnülinin faydalı etkilerinin, diyabetik sıçanlarda bağırsak mikrobiyotası ile PFC gibi beyin bölgeleri arasındaki olası bir bağlantı ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Hosseinfard ve ark., 2019; Morshedi ve ark., 2020).

Bu çalışmanın bir başka bulgusu, K grubuna kıyasla YY grubunda PFC bölgesindeki *Cnr1* reseptör yoğunluğunun önemli ölçüde düşük olmasıdır. İlginç bir şekilde, *Cnr1* ekspresyonunun, K grubuna kıyasla Kİ grubunda daha yüksek olduğu ve YY grubuna kıyasla YYİ grubunda daha düşük olduğu görülmüştür. Birçok kanıt uzun süreli YY diyet tüketiminin, çeşitli dokularda endokannabinoidlerin ve/veya reseptör ekspresyonunun derişimlerini etkilediğini göstermektedir (Zamberlatti ve ark., 2017). *Cnr2* 'nin daha çok bağırsıklık hücrelerinde eksprese edildiği düşünülse de son zamanlarda PFC gibi beyin bölgelerinde de eksprese edildiği gösterilmiştir (García-Cabrerizo ve García-Fuster, 2016). Bir çalışmada, insülin direnci ve obezite indüklenmesi için erkek Wistar ratları 12 hafta boyunca yüksek yağlı/fruktozlu diyet ile beslenmiştir. Beta-karyofillerin HFFD'nin neden olduğu IR, oksidatif stres, nöroinflamasyon ve davranış değişikliklerini azalttığı, ayrıca vücut ağırlığındaki değişikliği azalttığı sonucuna varılmıştır. Tüm bu değişikliklerin PFC'deki *Cnr2* aktivasyonu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Youssef ve ark., 2019). Ancak, bu çalışmada K ve YY diyetlere inülin eklenmesi PFC'deki *Cnr2* ekspresyon düzeyini azaltmasına rağmen, gruplar arasında farklılık göstermemiştir.

Son zamanlarda, Christie ve ark. (2018) enerji ve glukoz homeostazının düzenlenmesinde rolü olduğu düşünülen ve obezitedeki disregülasyon göz önüne alındığında, *Trpv1*'in ağırlık kaybı tedavisi için bir hedef olabileceğini değerlendirmiştir. *Trpv1*'in endokannabinoidlerden olan AEA'nın bir agonisti olduğu ve ECS'nin bir parçası olduğu düşünülmüştür (Christie ve ark., 2018). Yapılan bir

çalışmada kahverengi yağ dokusunda kapsaisin ile *Trpv1* aktivasyonunun metabolizmayı ve enerji harcamasını arttırdığı görülmüştür ve diyetle ilgili obezitenin önlenmesinde yeni bir strateji olabileceği düşünülmüştür (Baskaran ve ark., 2017). Ancak, PFC'deki *Trpv1* ekspresyonunun ve dağılımının kapsamı henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Zhang ve ark., 2020). Bu çalışmada, istatistiksel bir farklılık olmamasına rağmen inülinin PFC'de *Trpv1* aktivasyonunu arttırdığını gözlenmiştir (Çizelge 3.6, Şekil 3.4).

β 3-adrenerjik reseptör (*Adrb3*), obezite gelişimi ile ilişkili genlerden biridir ve *Trp64Arg* polimorfizminin lipoliz ve termojenezini düzenleyerek obezite ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu düşünülmektedir (Maia-Landim ve ark., 2018). Amor ve ark., (2019) fonksiyonel bir besin (Yaşlı siyah sarımsak) içeren YY'ye yanıt olarak visceral yağ dokusunda *Adrb3*'ün aşırı ekspresyonu olduğunu belirlemiştir (Amor ve ark., 2019). Bununla birlikte, ratlarda diyetle ilgili obezitede artan adipozitenin β -adrenoseptör gen ekspresyonunun azalması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ding ve ark., 2016). Csanova ve ark., (2017) ardışık beş gün boyunca lipopolisakkarit tedavisinin ağırlık kaybı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Lipopolisakkarit ile tedavi edilen hayvanlarda *Adrb3* gen ekspresyonu prefrontal kortekste arttığı, ancak beyaz yağ dokusunda azaldığı sonucuna ulaşılmıştır (Csanova ve ark., 2017). Bu çalışmada ise *Adrb3* gen ekspresyonunun YY grubunda K-Kİ-YYİ gruplarına kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 3.6, Şekil 3.4). Bu durumun, PFC'de *Adrb*-cAMP yolunun bozulmuş aktivasyonu ile ilgili olabileceği düşünülmüştür. Çünkü bu çalışmanın bir diğer bulgusu, YY diyetle beslenen ratların PFC bölgesindeki *Adcy1* gen ekspresyonunun önemli ölçüde düşük olduğudur. Adenilat siklazlar, enerji homeostazında önemli bir yardımcı faktör olan ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü katalize etmektedir (Abdel-Halim ve ark., 2020). Ayrıca, *Adcy3* inhibe edilen farelerin yüksek yağlı diyetin neden olduğu obeziteye karşı daha savunmasız olduğu bulunmuştur (Wang ve ark., 2009). Vileigas ve ark., (2016) 33 haftalık YY diyetin neden olduğu obezitenin kalpteki beta-adrenerjik sinyalleme bozulduğunu ve bunun *Adcy* ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Vileigas ve ark., 2016). Bu çalışmanın sonuçları inülinin de PFC'deki *Adrb*-cAMP yolu üzerinde olumlu etkileri olabileceğini düşündürülebilir. İnülinin PFC'deki bu yollar üzerindeki olası etkilerini değerlendirmek

için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Hipotalamus, nükleus akumbens, amiglada ve hipokampus gibi mezokortikolimbik sistemdeki beynin diğer bölgeleri besin alımı, iştah ve obezite ile ilişkilidir. Ölçümler sadece PFC bölgesinde yapıldığından ve yağ dokusu analizinin olmaması mevcut çalışmanın bir sınırlamasını olabilir.

Bu sonuçlar diyetle inülin ilave edilmesinin hiperleptinemiye iyileştirdiğini, besin tüketimini ve ağırlık artışını azalttığını göstermektedir ve inülin ilavesinin obezite gelişimini önleyebileceğini düşündürmektedir. Muhtemel mekanizmanın, prefrontal kortekste bu sistemle ilgili gen ekspresyonundaki ve lipid metabolizmasındaki değişikliklerle endokannabinoid sistemi düzenlemek olabileceği düşünülmüştür. Çünkü YY diyetle inülin ilave edilmesi, PFC'de *Adrb3* ve *Adcy1* ekspresyon düzeyini, AEA ve 2-AG düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır. İnülinin, obeziteyi önlemedeki olası mekanizmasının, PFC'deki endokannabinoid sistemin, bu sistem ve lipid metabolizması ile ilgili gen ekspresyonunda modifikasyonlar yolu ile, regülasyonu olabileceği düşünülmüştür. İnülinin ağırlık düzenlemesindeki olumlu etkilerinin bir başka açıklaması, EKS'nin mikrobiyota-bağırsak-beyin eksenini üzerindeki etkileri olabilir. İnülin de prebiyotik bir kaynak olarak kabul edildiğinden, etkilerini bağırsak-beyin eksenini üzerinde gösterebilir. Mikrobiyota-endokannabinoidom-bağırsak-beyin eksenini lipid metabolizması, hormonal, pro-/anti-inflamatuvar ve nöral sinyallerin aracılık ettiği karmaşık bir iletişim sistemidir (Forto ve ark., 2020). Bu tezden elde edilen sonuçlar ile obezitenin önlenmesinde inülinin yararlı etkileri PFC'deki endokannabinoidler yoluyla ilk kez gösterilmiştir. İnülinin beyin bölgeleri üzerindeki etkilerinin tam mekanizmasını anlamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

İkinci kısımda YY diyetle inülin ilavesinin NAFLD üzerindeki etkileri karaciğer dokusu analizleri ile değerlendirilmiştir. Tez çalışması sonucunda YY'ye inülin ilavesinin, insülin direncini ve karaciğerde yağ birikimini önlediği, ayrıca kandaki AST ve TG düzeyini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Bu sonuçlar steatoz ve NAFLD aktivite skorları ile ilişkili bulunmuştur. Genel olarak, inülinin karaciğerde 2-AG düzeylerini azalttığı, *Cnr1* ve *Pnpla3* ekspresyonlarını önemli ölçüde baskıladığı görülmüştür ve inülin ilavesinin karaciğerde ECS yoluyla NAFLD'yi önleyebileceği hipotezi kabul edilmiştir. Yüksek yağlı diyetle beslenen ratlarda, inflamasyon skoru

önemli olmasa da, steatoz aktivite skoru ve toplam NAFLD skoru önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. YY ile karşılaştırıldığında, bu skorların YYİ'de yaklaşık %50 daha düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, inülin ilavesinin hem steatoz hem de inflamasyon parametrelerinde etkili olduğunu ve böylece NAFLD gelişimini önlediğini göstermektedir.

Bu çalışmada karaciğer dokularındaki AEA ve 2-AG düzeyleri istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir (Çizelge 3.7) ancak karaciğer *Cnr1* YY grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek miktarda eksprese olmuştur (K grubundan yaklaşık 7 kat, Kİ grubundan yaklaşık 17 kat, YYİ grubundan yaklaşık 3 kat daha fazla) (Çizelge 3.6, Şekil 3.5). Ayrıca karaciğerde eksprese olan *Cnr1* ile toplam steatoz skoru ve NAS değeri pozitif korelasyon göstermiştir (Çizelge 3.8). Dolayısı ile *Cnr1* ekspresyonundaki artışın karaciğerde lipogenezin artması ile sonuçlandığı söylenebilir. *Cnr1* reseptörlerinin yağlı karaciğer oluşumu üzerinde patofizyolojik etkilere sahip olduğunu gösteren bir çalışmada bu reseptörlerin inhibe edilmesinin NAFLD'de lipogenezi iyileştirdiği belirlenmiştir (Shi ve ark., 2014). Bu çalışmanın sonuçları ile uyumlu olan bu sonuçlar birçok çalışmada da bulunmuştur (Osei-Hyiaman ve ark., 2005; Osei-Hyiaman ve ark., 2008; Chang ve ark., 2018). Bu çalışmada hem K hem de YY diyetine inülin ilave edilmesi ile karaciğer dokularındaki *Cnr1* ekspresyonunun düştüğü görülmüştür. Dolayısı ile inülin desteğinin NAFLD gelişimini önleyici etki mekanizmalarından birinin karaciğer dokularındaki *Cnr1* inhibisyonu olduğu düşünülebilir.

Cnr2 ekspresyonu ise etkileri henüz kanıtlanmasa da daha çok hepatik inflamasyon ile ilişkilendirilmektedir (Rossi ve ark., 2012). Bu çalışmada karaciğerdeki *Cnr2* ekspresyonu steatoz gelişimi ile ilişkilendirilse de lobüler inflamasyon ilişkili olmadığı görülmüştür. Ancak beyindeki *Cnr2* ekspresyonu hem steatoz, hem inflamasyon hem de NAS değeri ile pozitif ilişkilidir (Çizelge 3.8). Yapılan bir çalışmada da hem steatoz hem de inflamasyon gelişiminde *Cnr2* ekspresyonunun anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir (Mendez-Sanchez ve ark., 2007). Ayrıca bu çalışmada beyin AEA ve 2-AG düzeyleri beyindeki *Cnr2* ekspresyonu ile ve karaciğer 2-AG düzeyi karaciğerdeki *Cnr1* ekspresyonu ile ilişkili bulunmuştur

(Çizelge 3.9). Dolayısı ile inülin desteğinin NAFLD gelişimini önleyici etkileri beyindeki AEA ve 2-AG düzeyleri ile *Cnr2* ekspresyonunun inaktivasyonu ve karaciğerdeki *Cnr1* inhibisyonu ile açıklanabilir. 2-AG sentezinin steatojenik faktörler (yüksek yağlı diyet gibi) tarafından uyarıldığı ve *Cnr1* ekspresyonundaki artışın 2-AG sentezini indüklediği belirtilmektedir (Purohit ve ark., 2010). Ayrıca 2-AG'nin NAFLD'deki karaciğer yağ miktarı ile pozitif bir korelasyonu olduğu, bunun da 2-AG'nin de novo lipogenezi artırabileceği düşünülmektedir (Dibba ve ark., 2018). Bu çalışmada, inülin ilavesi sonrası 2-AG düzeyinin önemli derecede düştüğü görülmüştür. Bu nedenle, NAFLD gelişiminin önlenmesinde inülinin etki mekanizmalarından birinin karaciğer dokularında *Cnr1* inhibisyonu olduğu düşünülebilir. Ayrıca, *Cnr1* ekspresyonunun artması, lipogenezi arttıran bir faktör olan transkripsiyon faktörü sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinin (*Srebp-1c*) ekspresyonunu indükleyebilir. Karaciğerde *Cnr1* ekspresyonunun inhibisyonu, *Srebp-1c* gibi lipogenez faktörlerinin ekspresyonlarını azalttığı ve böylece NAFLD'de lipogenezi iyileştirebildiği görülmüştür (Shi ve ark., 2014). Güncel çalışmalar, inülinin YY ile indüklenen obeziteyi ve yağlı karaciğeri önemli ölçüde hafiflettiğini ve YY'nin neden olduğu bağırsak mikrobiyotası disbiyozunu iyileştirdiğini göstermiştir (Aoki ve ark., 2021; Li ve ark., 2021). Hayvan çalışmalarında *Cnr1* ekspresyonunun azalmasının besin tüketimini azalttığı ve enerji tüketimini arttırdığı ve bunun NAFLD gibi metabolik hastalıklarda bir iyileşme sağladığı olası bir mekanizma olarak düşünülmektedir (Jourdan ve ark., 2010; Mallat ve ark., 2011).

Bu çalışmada gruplar arasında karaciğer *Trpv1* gen ekspresyonu arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (Çizelge 3.6). Ayrıca karaciğer AEA düzeyi ile *Trpv1* ekspresyonu arasında negatif ilişki bulunmuştur (Çizelge 3.9). Ancak *Trpv1* gen ekspresyonu ile steatoz, lobüler inflamasyon ve NAS değerleri arasındaki ilişki negatif olsa da anlamlı değildir (Çizelge 3.8). Yüksek yağlı diyetle inülin eklenmesi karaciğerde *Trpv1* aktivasyonunu arttırmıştır ancak bu artış NAFLD'nin önlenmesi ile ilişkilendirilememiştir. Bir çalışmada, *Trpv1* aktivasyonu ile karaciğerde lipid birikimi ve trigliserit düzeyi azaldığı (24 hafta sonra) görülmüştür ancak bu *Trpv1* inaktif olan dokularda olduğu ve bu genin uzun süre aktivasyonunun gerekli olabileceği belirtilmiştir (Li ve ark., 2012). Bu çalışmada 12 haftalık süreden daha fazla inülin

eklenmesi durumunun devam etmesi halinde *Trpv1* aktivasyonunun artması ile NAFLD'yi önleyici etkilerinin daha iyi gözlenebileceği düşünülebilir.

Daha çok adipoz dokuda eksprese edilen *Adrb3* geninin kahverengi adipositlerde termojenezi ve beyaz adipoz dokularında lipolizi arttırdığı düşünülmektedir (Emorine ve ark., 1994). Ancak bu çalışmada beyin ve karaciğer dokularındaki ekspresyonu değerlendirilmiştir. *Adrb3* geninin karaciğer dokularındaki ekspresyonu gruplar arasındaki farklılık göstermese de, YY grubun beyin dokularında anlamlı derecede daha fazla eksprese olmuştur (Çizelge 3.6). Bu durum steatoz ve NAS değeri ile pozitif ilişkilidir (Çizelge 3.8). Ayrıca *Adrb3* ekspresyonunun beyin AEA ve karaciğer 2-AG düzeyleri ile de pozitif ilişkili olduğu görülmüştür (Çizelge 3.9). Buna göre *Adrb3* geni endokannabinoid sistemin beyinde iştah metabolizmasını karaciğerde lipid metabolizmasını etkilediği ortak gen olarak düşünülebilir. Sonuçlarımızın aksine bir çalışmada beyin dokularına *Adrb3* enjekte edilmesi ile iştahın baskılandığı ve insülin salınımının arttığı görülmüştür (Richard ve ark., 2017). *Adrb3* geninin bu etkilerine yönelik daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

NAFLD ile güçlü bir ilişkisi bulunduğu belirtilen *Pnpla3* geni daha çok çoklu doymamış yağ asitlerinin metabolizması ile ilişkilendirilmektedir ve yağlı karaciğer hastalıklarının temel nedenlerinin aydınlatılabilmesi için önemli bir gendir (Hyysalo ve ark., 2014; Bruschi ve ark., 2017). Yağlı karaciğer hastalığında gen ekspresyon düzeyi oldukça yükselmektedir. Yapılan bir çalışmada yaş, cinsiyet, bel çevresi ve HOMA-IR kadar *Pnpla3* ve *Cnr2* genlerinin de karaciğer yağlanması ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (Rossi ve ark., 2012). Bu çalışmada *Pnpla3* geni YY grubunda diğer gruplara kıyasla oldukça yüksek düzeyde eksprese olmuştur. İnülin ilave edilmesi ile karaciğer dokularındaki *Pnpla3* gen ekspresyonu anlamlı derecede azalmıştır (Çizelge 3.6). Bu azalma steatoz ve toplam NAS değeri ile de ilişkili bulunmuştur (Çizelge 3.8). Dolayısı ile inülinin NAFLD önleyici etkilerinden birinin de karaciğerde *Pnpla3* ekspresyonunu baskılaması olduğu söylenebilir. Rodriguez ve ark. (2020), inülinin, *Srebp1* ve *Srebp2* proteinlerinin nükleer ekspresyonunu ve lipojenik genlerin mRNA ekspresyonunu azaltarak hepatik lipid içeriğini azalttığını göstermiştir (Rodriguez ve ark., 2020). *Pnpla3*'ün özellikle

alipojenik kapasitede işlev görebileceği ve *Pnpla3* inhibisyonunun NAFLD ile ilişkili hepatik insülin direncinin tedavisi için yeni bir terapötik yaklaşım olabileceği belirtilmektedir (Kumashiro ve ark., 2013). Buna uygun olarak, sonuçlarımız inülin ilavesinin *Pnpla3* ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Bu nedenle inülinin NAFLD inhibitör etkilerinden birinin karaciğerde *Pnpla3* ekspresyonunu baskılaması olduğu söylenebilir.

Gnas gen ekspresyonu ile hepatoselüler adenom arasında ilişki bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Gnas* ekspresyonu ve bening tümör gelişimi ile karakterize ileri düzey sirozlu karaciğer hasarı arasında korelasyon tespit edilmiştir (Nault ve ark., 2012; Nault ve ark., 2017). Ancak bu gen ile NAFLD gelişimi arasındaki ilişkiye yönelik çalışma sayısı yetersizdir. Bu çalışmada karaciğerdeki *Gnas* gen ekspresyonu ile toplam NAS değeri arasında zayıf da olsa anlamlı bir ilişki görülmüştür. Ancak bu durum yüksek yağlı diyet ve yüksek yağlı diyete inülin ilavesi ile ilişkilendirilememiştir (Çizelge 3.8). Sadece standart diyete inülin ilave edilmesi ile (K grubuna göre Kİ grubunda) bu genin ekspresyon düzeyinin anlamlı derecede düştüğü belirlenmiştir. NAFLD ile *Gnas* gen ekspresyon düzeyi ilişkisine yönelik sonuçlarımız diğer çalışmalar için yeni bir kaynak olacaktır.

Bu çalışmada *Adcy1* gen ekspresyonu hem beyin hem de karaciğer dokularındaki ekspresyon miktarları gruplar arasında farklı bulunmuştur. Ancak diyet modelleri ile gen ekspresyonu ilişkisi dokular arasında farklılık göstermiştir. Beyinde *Adcy1* gen ekspresyonu K grubuna kıyasla Kİ grubunda daha düşük iken YYİ grubunda YY grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Karaciğerde ise *Adcy1* ekspresyonu inülin eklenen gruplarda eklenmeyenlere kıyasla daha düşüktür. Sonuçlarımız karaciğerde *Adcy1* ekspresyonunun sadece YY'de arttığını ve diğerlerinde baskılandığını göstermiştir (Çizelge 3.6). Steatoz ve toplam NAS değerleri de sadece karaciğerdeki ekspresyon ile ilişkili bulunmuştur (Çizelge 3.8). Dolayısı ile inülin ilavesi *Adcy1* geninin karaciğerdeki ekspresyon düzeyini azaltarak NAFLD gelişimini önleyebilir sonucuna ulaşılabilir. Ancak bunu kanıtlayıcı daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Çünkü posthoc testine göre karaciğerde eksprese edilen gen düzeyi sadece YY ve Kİ arasında anlamlı derecede farklıdır. *Adcy1* geninin aktivasyonu ile ATP cAMP'ye

dönüşümü hızlanmaktadır (Schiavon ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyetin karaciğerde cAMP düzeyini baskıladığı görülmüştür. *Adcy1* aktivatörlerinin verilmesi ile cAMP normal düzeye dönmüş ve bunun *Adcy1* aktivasyonu ile sağlanabileceği belirtilmiştir (Zingg ve ark., 2016). Awaad ve ark. (2020), 14 hafta boyunca yüksek yağlı beslenme ile birlikte deney hayvanlarının karaciğer dokularında cAMP ekspresyonunun devamlı arttığını ve kontrol grubuna göre 4. haftadan itibaren anlamlı derecede yüksek düzeyde eksprese edildiğini bulmuştur. cAMP düzeylerindeki artışı ADCY'in katalizlediğini belirtmiştir (Awaad ve ark., 2020). Bu çalışmada inülin ilavesinin beyindeki *Adcy1* ekspresyonunu arttırdığı aksine karaciğerdeki ekspresyon düzeyini azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Ancak bunun cAMP düzeyi ile ilişkili olup olmadığı bu çalışma sonucuna göre söylenemez.

NAFLD gelişiminde önemli parametlerden bir diğeri insülin direncidir (IR) (Chalasani ve ark., 2018). Bu çalışmada yüksek yağlı beslenen grubun HOMA-IR değeri ortalama 4.42 ile diğer gruplardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) ve insülin direnci gelişimi görülmüştür. İnülin eklenen yüksek yağlı grupta bu skor 2.49 olmuştur. Kontrol diyetle inülin eklenmesi ile HOMA değerinin daha da düşük olduğu görülmüştür (Çizelge 3.3). Yapılan bir meta analiz çalışmasında diyetle eklenen inülinin özellikle Tip 2 diyabetli ve obez bireylerde insülin direncini iyileştirdiği belirtilmiştir (Rao ve ark., 2019). Bu çalışmada inülin desteğinin yüksek yağlı beslenme olmasına rağmen insülin direnci gelişimini önlediği görülmüştür. Ayrıca çalışma sonucunda insülin direnci ile birlikte dislipidemi parametrelerinde de inülin ilavesinin olumlu etkileri görülmüştür. Serum trigliserit (TG) ve toplam kolesterol (TK) düzeylerinin yüksek yağlı beslenmede anlamlı derecede daha yüksek, LDL kolesterol düzeyinin anlamlı olmasa da daha yüksek, olduğu görülmüştür. Yüksek yağlı diyetle inülin ilave edilen grupta bu parametrelerin istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu ($p<0.05$) ve dolayısı ile inülin desteğinin kan lipid parametrelerinde (özellikle TG ve TK), iyileşme gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Benzer sonuçlar serum AST düzeyi için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 3.3). Bao ve ark. (2020) yaptığı bir çalışmada 14 hafta yüksek yağlı diyetle beslenen deney hayvanlarında AST, ALT, TK, TG düzeylerinin yüksek yağlı diyetle

5g/kg miktarınca oral olarak inülin verilen gruba göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu, inülinin NAFLD parametrelerinde iyileşme sağladığı ve NAFLD gelişimini önlediği görülmüştür (Bao ve ark., 2020).

Leptin ile birlikte adiponektinin NAFLD tanısında ve sınıflandırılmasında potansiyel biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir (Marques ve ark., 2021). Adiponektin diğer adipokinlere kıyasla NAFLD/NASH ile daha yakından ilişkilendirilmektedir ve obezite ve metabolik hastalık durumunda adiponektin serum düzeyi düşmektedir (Finelli ve Tarantino, 2013). Bu çalışmada YY diyetine inülin ilave edilmesi ile birlikte adiponektin düzeyinin bir miktar yüksek olduğu (yaklaşık %20) görülmüştür (Çizelge 3.3). Ayrıca adiponektin düzeyi lobüler inflamasyon ve NAS değeri ile anlamlı derecede negatif korelasyon göstermiştir (Çizelge 3.8). Benzer sonuçların görüldüğü bir çalışmada, adiponektinin NAFLD patogenezindeki rolü karaciğer inflamasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Mavilia ve Wu, 2021). Ayrıca, Zhang ve ark. (2021) adiponektin düzeyinin NAFLD'deki insülin direnci ile de güçlü korelasyon gösterdiğini belirlemiştir (Zhang ve ark., 2021). Bu durum bu çalışmada beyin dokularındaki AEA düzeyi ve karaciğer dokularındaki 2-AG düzeyi ile ilişkili bulunmuştur (Çizelge 3.9). Deney hayvanları üzerinde yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyet ile indüklenen hepatik steatozun tersine çevrilmesine adiponektinin aracılık ettiği belirtilmiştir (Tam ve ark., 2014). Adiponektin düzeyinin NAFLD riski ve şiddeti ile ilişkili bulunduğu bir çalışmada, PNPLA ekspresyonu ile de negatif ilişkili olduğu bulunmuştur (Valenti ve ark., 2010). Bu çalışmada inülin eklenen gruplarda adiponektin düzeyinin daha yüksek olduğu ve NAFLD parametrelerinde olumlu etkiler gösterdiği ve bu metabolik yolağa yukarıda ifade edilen endokanabidoidler ve gen ekspresyonlarının etkileri ile aracılık edebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç olarak, YY diyetine rağmen 12 hafta boyunca diyetine inülin (%15) ilavesi NAFLD'de steatoz gelişimini önemli ölçüde önlemiştir. İnsülin direnci gelişimi önlenmiş ve bu durum kan lipid parametrelerine (TG ve TG) ve serumdaki AST düzeylerine olumlu yansımıştır. Karaciğerde *Cnr1* ve *Pnpla3* gen ekspresyon düzeyleri önemli ölçüde azalmıştır. Bu sonuçların tümünün steatoz ile anlamlı olarak ilişkili olduğu görülmüştür. Tüm bu sonuçlar, NAFLD'deki lipogenez faktörlerinin

belirlenebilmesi ve altta yatan metabolik yolların aydınlatılabilmesi için yeni bir referans olacaktır. Son zamanlarda, mikrobiyota-bağırsak-karaciğer-beyin ekseninin NAFLD/NASH patogenezinde önemli bir düzenleyici rol oynadığı belirtilmektedir (Ding ve ark., 2020). İnülin oligofruktoz yapısında bir prebiyotik olarak tanımlandığı için, her ne kadar mikrobiyota değerlendirmesi Bu çalışmada yer almasa da inülinin NAFLD gelişimini önleyici etkilerini mikrobiyota-bağırsak-karaciğer-beyin aksı üzerinden göstermiş olması muhtemeldir. Beyin ve karaciğer doku analizleri ile bu etkilerin bir kısmı bu çalışmada gösterilmiştir. Mikrobiyota-bağırsak-karaciğer-beyin aksını kapsayıcı genişletilmiş çalışma ile bu sonuçlar daha da güçlendirilebilir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezde “uzun süreli inülin desteği, diyetle indüklenen obeziteyi ve insülin direncini endokanabinoid sistem yolağı üzerinden azaltabilir ve NAFLD gelişimini önleyebilir” hipotezi doğrultusunda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

Yüksek yağlı beslenme olmasına rağmen 12 hafta süresince diyetle inülin (%15) ilave edilmesi NAFLD’de steatoz gelişimini anlamlı ölçüde önlemiştir. Özellikle insülin direnci ve obezite gelişimi önlenmiş ve bu durum serumda kan lipid parametreleri (TG ve TK) ve AST düzeylerine olumlu yansımıştır. Ayrıca dokulardaki endokanabinoid düzeyleri de etkilenmiştir. Karaciğerde *Cnr1* ve *Pnpla3* ile beyinde *Adrb3* ve *Gnas* gen ekspresyon düzeylerinin önemli ölçüde inhibe edildiği görülmüştür. Bu sonuçların tamamı steatoz ile anlamlı olarak ilişkilendirilmiştir. Sonuç olarak inülin beyin ve karaciğer dokularında endokanabinoid sistemi etkileyerek ve bazı gen ekspresyonlarını baskılayarak NAFLD gelişimini önlemiştir. Daha önce insanlar üzerinde yürütülen çalışmamızda inülinin vücut yağ miktarını azaltarak abdominal obezite ve ağırlık yönetimine olumlu etkileri gösterilmişti. Bu tez çalışması ile deney hayvanlarında moleküler metabolizmaları araştırılmıştır. Tüm bu sonuçlar NAFLD’deki lipogenez faktörlerinin belirlenerek altta yatan metabolik yolakların aydınlatılabilmesi için literatüre yeni bir kaynak olacağı düşünülmektedir.

NAFLD hastalarının diyet modifikasyonları gibi yaşam tarzı değişiklikleri NAFLD parametreleri üzerinde olumlu etkiler göstermektedir. Özellikle obezite gelişimi olan bireylerde ağırlık kaybı NAFLD üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Ayrıca inülin desteğinin insülin direnci gelişimi üzerine olumlu etkileri birçok çalışma ile gösterilse de moleküler mekanizmalar tam olarak kanıtlanmamıştır. Bu çalışmanın sonuçları inülin ilavesinin insülin direnci gelişimini önlemesi nedeni ile önemlidir ve altta yatan yolakların tanımlanmasına kaynak olacağı düşünülmektedir.

NAFLD tedavisinde en etkili diyet modeli olarak Akdeniz diyeti gibi düşük kalorili, bitkisel ürünler ağırlıklı diyetler önerilmektedir. İnülinin NAFLD tedavisinde

de kullanımına yönelik literatürde birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda inülin çoğunlukla ekstrakte edilerek verilmiştir. Ancak besinlerdeki inülin miktarına yönelik araştırmaların artırılması gerekmektedir. Diyetel lif olarak prebiyotikler arasında yer alan inülin de NAFLD'ye yönelik beslenme önerilerinde yer alabilecek bir besindir.

Bu çalışmada inülinin beyin ve karaciğer dokularındaki gen ekspresyon ve endokanabinoid düzeylerini etkilemesi üzerinden NAFLD gelişimini önleyici etkileri değerlendirildiğinde ve inülinin aynı zamanda prebiyotik kaynağı olduğu düşünüldüğünde mikrobiyota-bağırsak-karaciğer-beyin aksı üzerine etkili olabileceği düşünülebilir. Bu çalışmada bu aksın beyin ve karaciğer bölümlerine referans olabilecek sonuçlar bulunmuştur. Altta yatan mekanizmaların daha fazla aydınlatılabilmesi için ileride yapılacak çalışmalar mikrobiyota analizleri ile zenginleştirilebilir.

ÖZET

Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Wistar Ratlarında İnülin Desteğinin Endokanabinoid Düzeyi, Karaciğer Yağlanması ve İnsülin Direnci Üzerine Etkileri

Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) dünya genelindeki karaciğer hastalıklarının önemli nedenlerinden biridir. Hastalığın başlamasına ve ilerlemesine çeşitli moleküler mekanizmalar etkili olsa da kesin bir yolak henüz netlik kazanmamıştır. Güncel çalışmalarda NAFLD patolojisinde endokanabinoid sistemin de etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle bu çalışmanın amacı yüksek yağlı beslenme modelinde inülin ilavesinin endokanabinoid sistem aracılığı ile NAFLD üzerindeki etkilerini incelemektir. Bu çalışma inülinin endokanabinoid sistem yolağı ile NAFLD üzerindeki etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Toplam 25 erkek Wistar türü rat dört gruba ayrılarak 12 hafta bu diyetler ile beslenmiştir; kontrol, kontrol+inülin, yüksek yağlı ve yüksek yağlı+inülin. Biyokimyasal parametreler tam otomatik biyokimya analizörü ile ve insülin, leptin, ghrelin ve adiponektin düzeyleri Sandwich-ELISA yöntemi ile ratların serumlarında analiz edilmiştir. Karaciğer dokularının histopatolojik analizleri ve manyetik rezonans görüntüleme ile steatoz, lobüler inflamasyon ve toplam NAS değerleri belirlenmiştir. LC-MS/MS yöntemi ile karaciğer ve beyin dokularındaki Anandamid ve 2-Araşidonilgliserol endokanabinoid düzeyleri ölçülmüştür. Karaciğer ve beyin dokularında qPCR yöntemi ile *Cnr1*, *Cnr2*, *Trpv1*, *Adrb3*, *Pnpla3*, *Gnas* ve *Adcy1* gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. 12. haftanın sonunda yüksek yağlı diyetle beslenen grubun steatoz skoru 2.66 ± 0.42 ile diğer gruplardan anlamlı derecede daha yüksek olmuştur. İnülin obezite, HOMA-IR, serum trigliserit, toplam kolesterol, AST ve leptin düzeylerini olumlu etkilemiştir. Ayrıca inülin beyinde *Adrb3*, *Gnas* ve *Adcy1* gen ekspresyonlarını, karaciğerde *Cnr1* ve *Pnpla3* gen ekspresyonlarını anlamlı derecede azaltmıştır. İnülin eklenen grupların karaciğer ve beyin dokularındaki 2-AG düzeyi daha düşük bulunmuştur. İnülin endokanabinoidler aracılığı ile karaciğerde NAFLD patogenezinde yer alan genlerin ekspresyonlarını etkileyerek NAFLD gelişimini önlemiştir ve bu çalışmanın sonuçları inülinin obezite, insülin direnci, dislipidemi ve NAFLD tedavisinde umut verici bir besin bileşeni olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: 2-Araşidonilgliserol, Anandamid, İnülin, Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı

SUMMARY

Effects of Inulin Supplementation on Endocannabinoid Levels, Fatty Liver and Insulin Resistance in Wistar Rats Fed with High Fat Diet

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the major causes of liver disease worldwide. Although various molecular mechanisms are effective in the initiation and progression of NAFLD, the exact pathway is not completely clarified. In recent studies, it is thought that the endocannabinoid system may also be effective in NAFLD pathology. Therefore, the aim of this study is to examine the effects of inulin supplementation on NAFLD via the endocannabinoid system in a high-fat diet model. This is the first study to investigate the effects of inulin by endocannabinoid system pathway on NAFLD. Methods: A total of 25 male Wistar rats were divided into four groups and fed with these diets for 12 weeks: control, control+inulin, high fat and high fat+inulin. Biochemical parameters were analyzed with a fully automatic biochemistry analyzer and insulin, leptin, ghrelin and adiponectin levels were analyzed in the serum of rats by Sandwich-ELISA method. Steatosis, lobular inflammation and total NAS values were determined by histopathological analysis of liver tissues and by magnetic resonance imaging. Anandamide and 2-arachidonylglycerol endocannabinoid levels in liver and brain tissues were measured by LC-MS/MS method. *Cnr1*, *Cnr2*, *Trpv1*, *Adrb3*, *Pnpla3*, *Gnas* and *Adcy1* gene expression levels were determined in liver and brain tissues by qPCR method. Results: At the end of the 12th week, the steatosis score of the high-fat diet group was 2.66 ± 0.42 , which was significantly higher than the other groups. Inulin positively affected obesity, HOMA-IR, serum triglyceride, total cholesterol, AST and leptin levels. Inulin also significantly decreased *Adrb3*, *Gnas* and *Adcy1* gene expressions in the brain, and *Cnr1* and *Pnpla3* gene expressions in the liver. The 2-AG levels in the liver and brain tissues were lower in the inulin added groups. Conclusions: Inulin prevented the development of NAFLD by affecting the expression of genes involved in the pathogenesis of NAFLD in the liver via endocannabinoids. The results of this study show that inulin may be a promising nutrient in the treatment of obesity, insulin resistance, obesity and NAFLD.

Keywords: 2-Arachidonylglycerol, Anandamide, Inulin, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

KAYNAKLAR

- ABDEL-HALIM SM, AL MADHOUN A, NIZAM R, MELHEM M, CHERIAN P, AL-KHAIRI I, HADDAD D, ABU-FARHA M, ABUBAKER J, BITAR MS, AL-MULLA F (2020). Increased Plasma Levels of Adenylate Cyclase 8 and cAMP Are Associated with Obesity and Type 2 Diabetes: Results from a Cross-Sectional Study. *Biology*, **9**(9): 244.
- ABOHALAKA R, BOZKURT TE, NEMUTLU E, ONDER SC, SAHIN-ERDEMLI I (2020). The effects of fatty acid amide hydrolase and monoacylglycerol lipase inhibitor treatments on lipopolysaccharide-induced airway inflammation in mice. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, **62**: 101920.
- ALAM S, NOOR-E-ALAM SM, CHOWDHURY ZR, ALAM M, KABIR J. (2013). Nonalcoholic steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease patients of Bangladesh. *World Journal Of Hepatology*, **5**(5): 281–287.
- ALMEDA-VALDES P, AGUILAR-OLIVOS N, URIBE M, MÉNDEZ-SÁNCHEZ N (2014). Common features of the metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Reviews on Recent Clinical Trials*, **9**(3): 148–158.
- ALPTEKİN IM, ERDOĞAN E, İSLER A, YANALAK EC, ÇAKIROĞLU FP, ARAS S (2022). Short-term effects of milkshake containing polydextrose and maltodextrin on subjective feelings of appetite, energy intake and blood glucose in healthy females. *Nutrition & Food Science*, **52**: 151-62.
- ALPTEKİN IM, ÇAKIROĞLU FP, ÖRMECİ N (2021). Effects of β -glucan and inulin consumption on postprandial appetite, energy intake and food consumption in healthy females: A randomized controlled trial. *Nutrition and Health*, 2601060211023256.
- ALPTEKİN IM, KESER A (2017). Effect of high fat diet on appetite regulation and obesity: endocannabinoid system pathway. *International Journal of Food Science and Nutrition*, **2**(5): 48-52.
- ALPTEKİN İM, KESER A (2016). Endokanabinoid sistem, insülin direnci ve yağ asitleri arasındaki ilişki. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, **44**(2): 144-53.
- AMACHER DE (2011). Strategies for the early detection of drug-induced hepatic steatosis in preclinical drug safety evaluation studies. *Toxicology*, **279**(1-3): 10–18.
- AMOR S, GONZÁLEZ-HEDSTROM D, MARTIN-CARRO B, INAREJOS-GARCIA AM, ALMODÓVAR P, PRODANOV M, GARCIA-VILLALÓN AL, GRANADO M (2019). Beneficial Effects of an Aged Black Garlic Extract in the Metabolic and Vascular Alterations Induced by a High Fat/Sucrose Diet in Male Rats. *Nutrients*, **11**(1): 153.
- ANGULO P. (2006). NAFLD, obesity, and bariatric surgery. *Gastroenterology*, **130**(6): 1848–1852.
- AOKI R, ONUKI M, HATTORI K, ITO M, YAMADA T, KAMIKADO K, KIM YG, NAKAMOTO N, KIMURA I, CLARKE JM, KANAI T, HASE K (2021). Commensal microbe-derived acetate

- suppresses NAFLD/NASH development via hepatic FFAR2 signalling in mice. *Microbiome*, **9**(1): 188.
- ARAÚJO AR, ROSSO N, BEDOGNI G, TIRIBELLI C, BELLENTANI S (2018). Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver International: Official Journal of The International Association For The Study Of The Liver*, **38**(1): 47–51.
- AUGUET T, BERLANGA A, GUIU-JURADO E, TERRA X, MARTINEZ S, AGUILAR C, FILIU E, ALIBALIC A, SABENCH F, HERNÁNDEZ M, DEL CASTILLO D, RICHART C (2014). Endocannabinoid receptors gene expression in morbidly obese women with nonalcoholic fatty liver disease. *Biomed Research International*, **2014**: 502542.
- AWAAD AK, KAMEL MA, MOHAMED MM, HELMY MH, YOUSSEF MI, ZAKI EI, ESSAWY MM, HEGAZY MGA (2020). The role of hepatic transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) during the development of experimental nonalcoholic fatty liver: a biochemical and histomorphometric study. *Egyptian Liver Journal*, **10**: 36.
- AZUMA H, PAULK N, RANADE A, DORRELL C, AL-DHALIMY M, ELLIS E, STROM S, KAY MA, FINEGOLD M, GROMPE M (2007). Robust expansion of human hepatocytes in *Fah*^{-/-}/*Rag2*^{-/-}/*Il2rg*^{-/-} mice. *Nature Biotechnology*, **25**(8): 903–910.
- BALDASSARRE M, GIANNONE FA, NAPOLI, L, TOVOLI A, RICCI CS, TUFONI M, CARACENI P (2013). The endocannabinoid system in advanced liver cirrhosis: pathophysiological implication and future perspectives. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, **33**(9): 1298–1308.
- BALSEVICH G, STICHT M, BOWLES NP, SINGH A, LEE T, LI Z, CHELIKANI PK, LEE FS, BORGLAND SL, HILLARD CJ, MCEWEN BS, HILL MN (2018). Role for fatty acid amide hydrolase (FAAH) in the leptin-mediated effects on feeding and energy balance. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, **115**(29): 7605–7610.
- BAO T, HE F, ZHANG X, ZHU L, WANG Z, LU H, WANG T, LI, Y, YANG S, WANG H (2020). Inulin exerts beneficial effects on non-alcoholic fatty liver disease via modulating gut microbiome and suppressing the lipopolysaccharide-toll-like receptor 4-m ψ -nuclear factor- κ b-nod-like receptor protein 3 pathway via gut-liver axis in mice. *Frontiers in Pharmacology*, **11**: 558525.
- BARAZZONI R, ZANETTI M, FERREIRA C, VINCI P, PIRULLI A, MUCCI M, DORE F, FONDA M, CIOCCHI B, CATTIN L, GUARNIERI G (2007). Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **92**(10): 3935–3940.
- BASARANOGLU M, BASARANOGLU G, SABUNCU T, SENTÜRK H. (2013). Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, **19**(8): 1166–1172.
- BASKARAN P, KRISHNAN V, FETTEL K, GAO P, ZHU Z, REN J, THYAGARAJAN B (2017). TRPV1 activation counters diet-induced obesity through sirtuin-1 activation and PRDM-16 deacetylation in brown adipose tissue. *International Journal of Obesity (2005)*, **41**(5): 739–749.

- BAZWINSKY-WUTSCHKE I, ZIPPRICH A, DEHGHANI F (2019). Endocannabinoid system in hepatic glucose metabolism, fatty liver disease, and cirrhosis. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(10): 2516.
- BEDOSSA P (2018). Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why liver biopsy is essential. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, **38**(1): 64–66.
- BELLENTANI, S, DALLE GRAVE R, SUPPINI A, MARCHESINI G, FATTY LIVER ITALIAN NETWORK (2008). Behavior therapy for nonalcoholic fatty liver disease: The need for a multidisciplinary approach. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **47**(2): 746–754.
- BERG AH, COMBS TP, DU X, BROWNLEE M, SCHERER PE. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nature medicine*, **7**(8): 947–953.
- BERGER D, DESAI V, JANARDHAN S (2019). Con: liver biopsy remains the gold standard to evaluate fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Liver Disease*, **13**(4): 114–116.
- BOURDY R, HERTZ A, FILLIOL D, ANDRY V, GOUMON Y, MENDOZA J, OLMSTEAD MC, BEFORT K (2021). The endocannabinoid system is modulated in reward and homeostatic brain regions following diet-induced obesity in rats: a cluster analysis approach. *European Journal of Nutrition*, **60**(8): 4621–4633.
- BROWN L, POUDYAL H, PANCHAL SK (2015). Functional foods as potential therapeutic options for metabolic syndrome. *Obesity Reviews: an Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, **16**(11): 914–941.
- BRUNT EM, KLEINER DE, WILSON LA, SANYAL AJ, NEUSCHWANDER-TETRI BA, NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS CLONOCAL RESEARCH NETWORK (2019). Improvements in histologic features and diagnosis associated with improvement in fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis: results from the nonalcoholic steatohepatitis clinical research network treatment trials. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **70**(2): 522–531.
- BRUSCHI FV, TARDELLI M, CLAUDEL T, TRAUNER M (2017). PNPLA3 expression and its impact on the liver: current perspectives. *Hepatic medicine: Evidence and Research*, **9**: 55–66.
- BUGIANESI E, GASTALDELLI A, VANNI E, GAMBINO R, CASSADER M, BALDI S, PONTI V, PAGANO G, FERRANNINI E, RIZZETTO M. (2005). Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*, **48**(4): 634–642.
- BUZZETTI E, PINZANI M, TSOCHATZIS EA (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: Clinical and Experimental*, **65**(8): 1038–1048.
- CANI PD, AMAR J, IGLESIAS MA, POGGI M, KNAUF C, BASTELICA D, NEYRINCK AM, FAVA F, TUOHY KM, CHABO C, WAGET A, DELMÉE E, COUSIN B, SULPICE T, CHAMONTIN B, FERRIÈRES J, TANTI JF, GIBSON GR, CASTEILLA L, DELZENNE NM, ALESSI MC, BURCELIN R (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, **56**(7): 1761–1772.

- CANI PD, DEWEVER C, DELZENNE NM (2004). Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *The British Journal of Nutrition*, **92**(3): 521–526.
- CARACENI P, DOMENICALI M, GIANNONE F, BERNARDI M (2009). The role of the endocannabinoid system in liver diseases. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **23**: 65–77.
- CARDINAL P, ANDRÉ C, QUARTA C, BELLOCCHIO L, CLARK S, ELIE M, LESTE-LASSERRE T, MAITRE M, GONZALES D, CANNICH A, PAGOTTO U, MARSICANO G, COTA D (2014). CB1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin. *Molecular Metabolism*, **3**(7): 705–716.
- CENCIONI MT, CHIURCHIÙ V, CATANZARO G, BORSELLINO G, BERNARDI G, BATTISTINI L, MACCARRONE M (2010). Anandamide suppresses proliferation and cytokine release from primary human T-lymphocytes mainly via CB2 receptors. *Plos One*, **5**(1): e8688.
- CHALASANI N, YOUNOSSI Z, LAVINE JE, CHARLTON M, CUSI K, RINELLA M, HARRISON SA, BRUNT EM, SANYAL AJ (2018). The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **67**(1): 328–357.
- CHANG E, KIM DH, YANG H, LEE DH, BAE SH, PARK CY (2018). CB1 receptor blockade ameliorates hepatic fat infiltration and inflammation and increases Nrf2-AMPK pathway in a rat model of severely uncontrolled diabetes. *Plos One*, **13**(10): e0206152.
- CHARYTONIUK T, ZYWNO H, BER, K, BZDEGA W, KOLAKOWSKI A, CHABOWSKI A, KONSTANTYNOWICZ-NOWICKA K. (2022). The Endocannabinoid system and physical activity-a robust duo in the novel therapeutic approach against metabolic disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(6): 3083.
- CHEN G, LI X, HE G, YU Z, LUO J, HE J, HUANG Z (2015). Low expression of GNAI3 predicts poor prognosis in patients with HCC. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8**(11): 21482–21486.
- CHORVAT RJ (2013). Peripherally restricted CB1 receptor blockers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **23**(17): 4751–4760.
- CHRISTIE S, WITTERT GA, LI H, PAGE AJ (2018). Involvement of TRPV1 Channels in Energy Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, **9**: 420.
- COLLINS S, SARZAN R, BORDICCHIA M (2014). Coordinate control of adipose 'browning' and energy expenditure by β -adrenergic and natriuretic peptide signalling. *International Journal of Obesity Supplements*, **4**(1): S17–S20.
- CORREA F, HERNANGÓMEZ M, MESTRE L, LORIA F, SPAGNOLO A, DOCAGNE F, DI MARZO V, GUAZA C (2010). Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB. *Glia*, **58**(2): 135–147.
- CSANOVA A, HLAVACOVA N, HASIEC M, POKUSA M, PROKOPOVA B, JEZOVA D (2017). β 3-Adrenergic receptors, adipokines and neuroendocrine activation during stress induced by

- repeated immune challenge in male and female rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, **20**(3): 294–302.
- CUZMAR V, ALBERTI G, UAUY R, PEREIRA A, GARCÍA C, DE BARBIERI F, CORVALÁN C, SANTOS JL, MERICQ V, VILLARROEL L, GANA JC (2020). Early obesity: Risk factor for fatty liver disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **70**(1): 93–98.
- da SILVA BORGES D, FERNANDES R, THIVES MELLO A, DA SILVA FONTOURA E, SOARES DOS SANTOS AR, SANTOS DE MORAES TRINDADE EB (2020). Prebiotics may reduce serum concentrations of C reactive protein and ghrelin in overweight and obese adults: a systematic review and meta analysis. *Nutrition Reviews*, **78**: 235-248.
- DAVOODI I, RAHIMI R, ABDOLLAHI M, FARZAEI F, FARZAEI MH, MEMARIANI Z, NAJAFI F (2017). Promising effect of Rosa damascena extract on high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **7**(4): 508–514.
- DELLA PEPA G, VETRANI C, LOMBARDI G, BOZZETTO L, ANNUZZI G, RIVELLESE AA. (2017). Isocaloric dietary changes and non-alcoholic fatty liver disease in high cardiometabolic risk individuals. *Nutrients*, **9**(10): 1065.
- DELZENNE NM, CANI PD, DAUBIOUL C, NEYRINCK AM (2005). Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *The British Journal of Nutrition*, **93**(1): S157–S161.
- DENK H, ABUJA PM, ZATLOUKAL K (2019). Animal models of NAFLD from the pathologist's point of view. *Biochimica et biophysica acta. Molecular Basis of Disease*, **1865**(5): 929–942.
- DI MARZO V, GOPARAJU SK, WANG L, LIU J, BÁTKAI S, JÁRAI Z, FEZZA F, MIURA GI, PALMITER RD, SUGIURA T, KUNOS G (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature*, **410**(6830): 822–825.
- DING JH, JIN Z, YANG XX, LOU J, SHAN WX, HU YX, DU Q, LIAO QS, XIE R, XU JY (2020). Role of gut microbiota via the gut-liver-brain axis in digestive diseases. *World Journal of Gastroenterology*, **26**(40): 6141–6162.
- DING L, ZHANG F, ZHAO MX, REN XS, CHEN Q, LI YH, KANG YM, ZHU GQ (2016). Reduced lipolysis response to adipose afferent reflex involved in impaired activation of adrenoceptor-cAMP-PKA-hormone sensitive lipase pathway in obesity. *Scientific Reports*, **6**: 34374.
- DONGIOVANNI P, ROMEO S, VALENTI L (2015). Genetic factors in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver and steatohepatitis. *Biomed Research International*, **2015**: 460190.
- DONNELLY KL, SMITH CI, SCHWARZENBERG SJ, JESSURUN J, BOLDT MD, PARKS EJ (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, **115**(5): 1343–1351.
- DREW JE, REICHARDT N, WILLIAMS LM, MAYER CD, WALKER AW, FARQUHARSON AJ, KASTORA S, FARQUHARSON F, MILLIGAN G, MORRISON DJ, PRESTON T, FLINT HJ, LOUIS P (2018). Dietary fibers inhibit obesity in mice, but host responses in the cecum and liver appear unrelated to fiber-specific changes in cecal bacterial taxonomic composition. *Scientific Reports*, **8**(1): 15566.

- DUWAERTS CC, MAHER JJ (2019). Macronutrients and the adipose-liver axis in obesity and fatty liver. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, **7**(4): 749–761.
- EL-HASCHIMI K, PIERROZ DD, HILEMAN SM, BJØRBAEK C, FLIER JS (2000). Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, **105**(12): 1827–1832.
- EMORINE L, BLIN N, STROSBERG AD (1994) The human β 3-adrenoceptor: The search for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* **15**: 3–7.
- ENGELI S (2008). Dysregulation of the endocannabinoid system in obesity. *Journal of Neuroendocrinology*, **20**: 110–5.
- EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (EASL), EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF DIABETES (EASD), & EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF OBESITY (EASO) (2016). EASL-EASD-EASO Clinical practice guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetologia*, **59**(6): 1121–1140.
- FABBRINI E, SULLIVAN S, KLEIN S (2010). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **51**(2): 679–689.
- FAKHOURY-SAYEGH N, TRAK-SMAYRA V, KHAZZAKA A, ESSEILY F, OBEID O, LAHOUD-ZOUEIN M, YOUNES H (2015). Characteristics of nonalcoholic fatty liver disease induced in wistar rats following four different diets. *Nutrition Research and Practice*, **9**(4): 350–357.
- FELLMANN L, NASCIMENTO AR, TIBIRIÇA E, BOUSQUET P (2013). Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacology & Therapeutics*, **137**(3): 331–340.
- FEROLLA SM, COUTO CA, COSTA-SILVA L, ARMILIATO GN, PEREIRA CA, MARTINS FS, FERRARI M, VILELA EG, TORRES HO, CUNHA AS, FERRARI TC (2016). Beneficial Effect of Synbiotic Supplementation on Hepatic Steatosis and Anthropometric Parameters, But Not on Gut Permeability in a Population with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients*, **8**(7): 397.
- FINCK BN (2018). Targeting metabolism, insulin resistance, and diabetes to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes*, **67**(12): 2485–2493.
- FORTE N, FERNÁNDEZ-RILO AC, PALOMBA L, DI MARZO V, CRISTINO L (2020). Obesity Affects the Microbiota-Gut-Brain Axis and the Regulation Thereof by Endocannabinoids and Related Mediators. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(5): 1554.
- FRANÇOIS M, BARDE S, LEGRAND R, LUCAS N, AZHAR S, EL DHAYBI M, GUERIN C, HOKFELT T, DÉCHELOTTE P, COÉFFIER M, FETISSOV SO (2016). High-fat diet increases ghrelin-expressing cells in stomach, contributing to obesity. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, **32**(6): 709–715.
- GABBAY E, AVRAHAM Y, ILAN Y, ISRAELI E, BERRY EM (2005). Endocannabinoids and liver disease--review. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, **25**(5): 921–926.

- GAGGINI M, MORELLI M, BUZZIGOLI E, DEFRONZO RA, BUGIANESI E, GASTALDELLI A (2013). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*, **5**(5): 1544–1560.
- GANZ M, CSAK T, SZABO G (2014). High fat diet feeding results in gender specific steatohepatitis and inflammasome activation. *World Journal of Gastroenterology*, **20**(26): 8525–8534.
- GARCIA-CABRERIZO R, GARCIA-FUSTER MJ (2016). Opposite regulation of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the prefrontal cortex of rats treated with cocaine during adolescence. *Neuroscience Letters*, **615**: 60–65.
- GARY-BOBO M, ELACHOURI G, GALLAS JF, JANIAK P, MARINI P, RAVINET-TRILLOU C, CHABBERT M, CRUCCIOLI N, PFERSDORFF C, ROQUE C, ARNONE M, CROCI T, SOUBRIÉ P, OURY-DONAT F, MAFFRAND JP, SCATTON B, LACHERETZ F, LE FUR G, HERBERT JM, BENSAID M (2007). Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology*, **46**: 122–9.
- GEIGER, BM, BEHR GG, FRANK LE, CALDERA-SIU AD, BEINFELD MC, KOKKOTOU EG, POTHOS EN (2008). Evidence for defective mesolimbic dopamine exocytosis in obesity-prone rats. *FASEB Journal: Official Publication of The Federation of American Societies for Experimental Biology*, **22**(8): 2740–2746.
- GELIEBTER A, LADELL T, LOGAN M, SCHNEIDER T, SHARAFI M, HIRSCH J (2006). Responsivity to food stimuli in obese and lean binge eaters using functional MRI. *Appetite*, **46**(1): 31–35.
- GLUCK ME, VISWANATH P, STINSON EJ (2017). Obesity, appetite, and the prefrontal cortex. *Current Obesity Reports*, **6**: 380–388.
- GONZÁLEZ-MARISCAL I, KRZYSIK-WALKER SM, DOYLE ME, LIU QR, CIMBRO R, SANTA-CRUZ CALVO S, GHOSH S, CIEŚLA Ł, MOADDEL R, CARLSON OD, WITEK RP, O'CONNELL JF, EGAN JM (2016). Human CB1 receptor isoforms, present in hepatocytes and β -cells, are involved in regulating metabolism. *Scientific Reports*, **6**: 33302.
- GREUTER T, MALHI H, GORES GJ, SHAH VH (2017). Therapeutic opportunities for alcoholic steatohepatitis and nonalcoholic steatohepatitis: exploiting similarities and differences in pathogenesis. *JCI Insight*, **2**(17): e95354.
- GUESS ND, DORNHORST A, OLIVER N, BELL JD, THOMAS EL, FROST GS (2015). A randomized controlled trial: the effect of inulin on weight management and ectopic fat in subjects with prediabetes. *Nutrition & Metabolism Journal*, **12**: 36.
- HAAS JT, FRANCQUE S, STAELS B (2016). Pathophysiology and mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *Annual Review of Physiology*, **78**: 181–205.
- HANDJIEVA-DARLENSKA T, BOYADJIEVA N (2009). The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, **65**(2): 157–164.
- HAQUE MR, ANSARI SH (2019). Aromatic aldehyde compound cuminaldehyde protects nonalcoholic fatty liver disease in rats feeding high fat diet. *Human & Experimental Toxicology*, **38**(7): 823–832.

- HARIRI N, THIBAUT L (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*, **23**(2): 270–299.
- HARROLD JA, HUGHES GM, O'SHIEL K, QUINN E, BOYLAND EJ, WILLIAMS NJ, HALFORD JC (2013). Acute effects of a herb extract formulation and inulin fibre on appetite, energy intake and food choice. *Appetite*, **62**: 84–90.
- HASHIMOTO E, TOKUSHIGE K (2011). Prevalence, gender, ethnic variations, and prognosis of NASH. *Journal of Gastroenterology*, **46**(1): 63–69.
- HE S, MCPHAUL C, LI JZ, GARUTI R, KINCH L, GRISHIN NV, COHEN JC, HOBBS HH (2010). A sequence variation (I148M) in PNPLA3 associated with nonalcoholic fatty liver disease disrupts triglyceride hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, **285**(9): 6706–6715.
- HOANG SA, OSEINI A, FEATHER RE, COLE BK, ASGHARPOUR A, VINCENT R, SIDDIQUI M, LAWSON MJ, DAY NC, TAYLOR JM, WAMHOFF BR, MIRSHAHI F, CONTOS MJ, IDOWU M, SANYAL AJ (2019). Gene expression predicts histological severity and reveals distinct molecular profiles of nonalcoholic fatty liver disease. *Scientific Reports*, **9**(1): 12541.
- HORVATH S, LANGFELDER P, KWAK S, AARONSON J, ROSINSKI J, VOGT TF, ESZES M, FAULL RL, CURTIS MA, WALDVOGEL HJ, CHOI OW, TUNG S, VINTERS HV, COPPOLA G, YANG XW (2016). Huntington's disease accelerates epigenetic aging of human brain and disrupts DNA methylation levels. *Aging*, **8**(7): 1485–1512.
- HOSSEINIFARD ES, MORSHEDI M, BAVAFA-VALENLIA K, SAGHAFI-ASL M (2019). The novel insight into anti-inflammatory and anxiolytic effects of psychobiotics in diabetic rats: possible link between gut microbiota and brain regions. *European Journal of Nutrition*, **58**(8): 3361–3375.
- HU Y, BHUPATHIRAJU SN, DE KONING L, HU FB (2014). Duration of obesity and overweight and risk of type 2 diabetes among US women. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, **22**(10): 2267–2273.
- HUME MP, NICOLUCCI AC, REIMER RA (2017). Prebiotic supplementation improves appetite control in children with overweight and obesity: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **105**: 790–799.
- HYYSALO J, GOPALACHARYULU P, BIAN H, HYOTYLÄINEN T, LEIVONEN M, JASER N, JUUTI A, HONKA MJ, NUUTILA P, OLKKONEN VM, ORESIC M, YKI-JÄRVINEN H (2014). Circulating triacylglycerol signatures in nonalcoholic fatty liver disease associated with the I148M variant in PNPLA3 and with obesity. *Diabetes*, **63**(1): 312–322.
- IRUNGBAM K, CHURIN Y, MATONO T, WEGLAGE J, OCKER M, GLEBE D, HARDT M, KOEPEL A, RODELFELD M, ROEB E (2020). Cannabinoid receptor 1 knockout alleviates hepatic steatosis by downregulating perilipin 2. *Laboratory Investigation; A Journal Of Technical Methods and Pathology*, **100**(3): 454–465.
- IZZO AA, BORRELLI F, CAPASSO R, DI MARZO V, MECHOULAM R (2009). Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in Pharmacological Sciences*, **30**(10): 515–527.

- JAHN D, KIRCHER S, HERMANN S HM, GEIER A (2019). Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, **1865**(5): 943–953.
- JARDON KM, CANFORA EE, GOOSSENS GH, BLAAK EE (2022). Dietary macronutrients and the gut microbiome: a precision nutrition approach to improve cardiometabolic health. *Gut*, **71**(6): 1214–1226.
- JENSEN T, ABDELMALEK MF, SULLIVAN S, NADEAU KJ, GREEN M, RONCAL C, NAKAGAWA T, KUWABARA M, SATO Y, KANG DH, TOLAN DR, SANCHEZ-LOZADA LG, ROSEN HR, LANASPA MA, DIEHL AM, JOHNSON RJ (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, **68**(5): 1063–1075.
- JHA P, KNOPF A, KOEFELER H, MUELLER M, LACKNER C, HOEFLE G, CLAUDEL T, TRAUNER M. (2014). Role of adipose tissue in methionine-choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1842**(7): 959–970.
- JIMÉNEZ-CORTEGANA C, GARCIA-GALEY A, TAM, M, DEL PINO P, CARMONA I, LÓPEZ S, ALBA G, SÁNCHEZ-MARGALET V. (2021). Role of leptin in non-alcoholic fatty liver disease. *Biomedicines*, **9**(7): 762.
- JOURDAN T, DJAOUTI L, DEMIZIEUX L, GRESENI J, VERGÈS B, DEGRACE P (2010). CB1 antagonism exerts specific molecular effects on visceral and subcutaneous fat and reverses liver steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes*, **59**(4): 926–934.
- KARLSSON HK, TUOMINEN L, HELIN S, SALMINEN P, NUUTILA P, NUMMENMAA L (2021). Mesolimbic opioid-dopamine interaction is disrupted in obesity but recovered by weight loss following bariatric surgery. *Translational Psychiatry*, **11**: 259.
- KIENESBERGER PC, OBERER M, LASS A, ZECHNER R (2009). Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *Journal of Lipid Research*, **50**: S63–S68.
- KILLGORE WD, YOUNG AD, FEMIA LA, BOGORODZKI P, ROGOWSKA J, YURGELUN-TODD DA (2003). Cortical and limbic activation during viewing of high- versus low-calorie foods. *Neuroimage*, **19**: 1381–94.
- KISMET K, OZCAN C, KURU S, GENÇAY CELEMLİ O, CELEPLİ P, SENES M, GUÇLU T, SORKUN K, HUCUMENOĞLU S, BESLER T (2017). Does propolis have any effect on non-alcoholic fatty liver disease?. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, **90**: 863–871.
- KITADA M, OGURA Y, SUZUKI T, MONNO I, KANASAKI K, WATANABE A, KOYA D (2018). A low-protein diet exerts a beneficial effect on diabetic status and prevents diabetic nephropathy in Wistar fatty rats, an animal model of type 2 diabetes and obesity. *Nutrition & Metabolism*, **15**: 20.
- KITADE H, CHEN G, NI Y, OTA T (2017). Nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance: new insights and potential new treatments. *Nutrients*, **9**(4): 387.

- KLEINER DE, BRUNT EM, VAN NATTA M, BEHLING C, CONTOS MJ, CUMMINGS OW, FERRELL LD, LIU YC, TORBENSON MS, UNALP-ARIDA A, YEH M, MCCULLOUGH AJ, SANYAL AJ, NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS CLINICAL RESEARCH NETWORK (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **41**(6): 1313–1321.
- KLOK MD, JAKOBSDOTTIR S, DRENT ML (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity Reviews*, **8**: 21-34.
- KOHLI R, FELDSTEIN AE (2011). NASH animal models: are we there yet?. *Journal of Hepatology*, **55**(4): 941–943.
- KOK N, ROBERFROID M, ROBERT A, DELZENNE N (1996). Involvement of lipogenesis in the lower VLDL secretion induced by oligofructose in rats. *The British Journal of Nutrition*, **76**(6): 881–890.
- KOSE S, AERTS-KAYA F, KOPRU ÇZ, NEMUTLU E, KUŞKONMAZ B, KARAOSMANOĞLU B, TASKIRAN EZ, ALTUN B, UCKAN CETINKAYA D, KORKUSUZ P (2018). Human bone marrow mesenchymal stem cells secrete endocannabinoids that stimulate in vitro hematopoietic stem cell migration effectively comparable to beta-adrenergic stimulation. *Experimental Hematology*, **57**: 30–41.e1.
- KRIEF S, LONNQVIST F, RAIMBAULT S, BAUDE B, VAN SPRONSEN A, ARNER P, STROBERG AD, RICQUIER D, EMORINE LJ (1993). Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *The Journal of Clinical Investigation*, **91**(1): 344–349.
- KUCERA O, CERVINKOVA Z (2014). Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World Journal of Gastroenterology*, **20**(26): 8364–8376.
- KUMASHIRO N, YOSHIMURA T, CANTLEY JL, MAJUMDAR SK, GUEBRE-EGZIABHER F, KURSAWE R, VATNER DF, FAT I, KAHN M, ERION DM, ZHANG XM, ZHANG D, MANCHEM VP, BHANOT S, GERHARD GS, PETERSEN KF, CLINE GW, SAMUEL VT, SHULMAN GI (2013). Role of patatin-like phospholipase domain-containing 3 on lipid-induced hepatic steatosis and insulin resistance in rats. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **57**(5): 1763–1772.
- KUROKAWA N, NAKAI K, KAMEO S, LIU ZM (2001). Satoh H. Association of BMI with the β 3-Adrenergic receptor gene polymorphism in Japanese: meta-analysis. *Obesity Research*, **9**(12): 741–745.
- KUROKAWA N, NAKAI K, KAMEO S, LIU ZM, SATOH H (2001). Association of BMI with the beta3-adrenergic receptor gene polymorphism in Japanese: meta-analysis. *Obesity Research*, **9**(12): 741–745.
- KOCH LK, YEH MM (2018). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Diagnosis, pitfalls, and staging. *Annals of Diagnostic Pathology*, **37**: 83-90.
- LAMBERT JE, PARNELL JA, EKSTEEN B, RAMAN M, BOMHOF MR, RIOUX KP, MADSEN, KL, REIMER RA (2015). Gut microbiota manipulation with prebiotics in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial protocol. *BMC Gastroenterology*, **15**: 169.

- LANG S, FAROWSKI F, MARTIN A, WISPLINGHOFF H, VEHRESCHILD M, KRAWCZYK M, NOWAG A, KRETZSCHMAR A, SCHOLZ C, KASPER P, RODEBURG C, LAMMERT F, GOESER T, STEFFEN HM, DEMIR M (2020). Prediction of advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease using gut microbiota-based approaches compared with simple non-invasive tools. *Scientific Reports*, **10**(1): 9385.
- LAU BK, COTA D, CRISTINO L, BORGLAND SL (2017). Endocannabinoid modulation of homeostatic and non-homeostatic feeding circuits. *Neuropharmacology*, **124**: 38-51.
- LI L, CHEN J, NI Y, FENG X, ZHAO Z, WANG P, SUN J, YU H, YAN Z, LIU D, NILIUS B, ZHU Z (2012). TRPV1 activation prevents nonalcoholic fatty liver through UCP2 upregulation in mice. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, **463**(5): 727–732.
- LIANG W, MENKE AL, DRIESSEN A, KOEK GH, LINDEMAN JH, STOOP R, HAVEKES LM, KLEEMANN R, VAN DEN HOEK AM (2014). Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *Plos One*, **9**(12): e115922.
- LIANG Y, LI Z, LIANG S, LI Y, YANG L, LU M, GU HF, XIA N (2016). Hepatic adenylate cyclase 3 is upregulated by Liraglutide and subsequently plays a protective role in insulin resistance and obesity. *Nutrition & Diabetes*, **6**(1): e191.
- LIMA ML, LEITE LH, GIODA CR, LEME FO, COUTO CA, COIMBRA CC, LEITE VH, FERRARI TC (2016). A Novel Wistar Rat Model of Obesity-Related Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by Sucrose-Rich Diet. *Journal of Diabetes Research*, **2016**: 9127076.
- LIU LY, ALEXA K, CORTES M, SCHATZMAN-BONE S, KIM AJ, MUKHOPADHYAY B, CINAR R, KUNOS G, NORTH TE, GOESSLING W (2016). Cannabinoid receptor signaling regulates liver development and metabolism. *Development*, **143**: 609–22.
- LIU Z, LI P, ZHAO ZH, ZHANG Y, MA ZM, WANG SX (2016). Vitamin B6 Prevents Endothelial Dysfunction, Insulin Resistance, and Hepatic Lipid Accumulation in Apoe (-/-) Mice Fed with High-Fat Diet. *Journal of Diabetes Research*, **2016**: 1748065.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, **25**(4): 402–408.
- LOOMBA R, ABRAHAM M, UNALP A, WILSON L, LAVINE J, DOO E, BASS NM, NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS CLINICAL RESEARCH NETWORK (2012). Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **56**(3): 943–951.
- LOOMBA R, FRIEDMAN SL, SHULMAN GI. (2021). Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell*, **184**(10): 2537–2564.
- LOWE CJ, REICHEL T AC, HALL PA (2019). The Prefrontal Cortex and Obesity: A Health Neuroscience Perspective. *Trends in Cognitive Sciences*, **23**(4): 349–361.

- LUYCKX FH, LEFEBVRE PJ, SCHEEN, AJ (2000). Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes & metabolism*, **26**(2): 98–106.
- MAIA-LANDIM A, RAMIREZ JM, LANCHO C, POBLADOR MS, LANCHO JL (2018). Long-term effects of Garcinia cambogia/Glucomannan on weight loss in people with obesity, PLIN4, FTO and Trp64Arg polymorphisms. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **18**(1): 26.
- MALLAT A, TEIXEIRA-CLERC F, DEVEAUX V, MANIN S, LOTERSZTAJN S (2011). The endocannabinoid system as a key mediator during liver diseases: new insights and therapeutic openings. *British Journal of Pharmacology*, **163**(7): 1432–1440.
- MARQUES V, AFONSO MB, BIERIG N, DUARTE-RAMOS F, SANTOS-LASO Á, JIMENEZ-AGUERO R, EIZAGUIRRE E, BUJANDA L, PAREJA MJ, LUÍS R, COSTA A, MACHADO MV, ALONSO C, ARRETXE E, ALUSTIZA JM, KRAWCZYK M, LAMMERT F, TINIAKOS DG, FLEHMIG B, CORTEZ-PINTO H, ... RODRIGUES C (2021). Adiponectin, Leptin, and IGF-1 Are Useful Diagnostic and Stratification Biomarkers of NAFLD. *Frontiers in Medicine*, **8**: 683250.
- MARTINEZ-UÑA M, LÓPEZ-MANCHEÑO Y, DIÉGUEZ C, FERNÁNDEZ-ROJO MA, NOVELLE MG (2020). Unraveling the Role of Leptin in Liver Function and Its Relationship with Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(24): 9368.
- MAVILIA MG, WU GY (2021). Liver and serum adiponectin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Digestive Diseases*, **22**(4): 214–221.
- MELANSON KJ, WESTERTERP-PLANTENGA MS, CAMPFIELD LA, SARIS WH (1999). Blood glucose and meal patterns in time-blinded males, after aspartame, carbohydrate, and fat consumption, in relation to sweetness perception. *The British Journal of Nutrition*, **82**(6): 437–446.
- MENDEZ-SANCHEZ N, ZAMORA-VALDES D, PICHARDO-BAHENA R, BARREDO-PRIETO B, PONCIANO-RODRIGUEZ G, BERMEJO-MARTINEZ L, CHAVEZ-TAPIA NC, BAPTISTA-GONZÁLEZ HA, URIBE M (2007). Endocannabinoid receptor CB2 in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver International: Official Journal of The International Association for The Study of The Liver*, **27**(2): 215–219.
- MIAO X, LIU G, XU X, XIE C, SUN F, YANG Y, ZHANG T, HUA S, FAN W, LI Q, HUANG S, WANG Q, LIU G, ZHONG D (2008). High expression of vanilloid receptor-1 is associated with better prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **186**(1): 25–32.
- MOHAMMED MS, SENDRA S, LLORET J, BOSCH I (2018). Systems and wbans for controlling obesity. *Journal of Healthcare Engineering*, **2018**: 1564748.
- MOON S, CHUNG GE, JOO SK, PARK JH, CHANG MS, YOON JW, KOO BK, KIM W (2022). A PNPLA3 Polymorphism Confers Lower Susceptibility to Incident Diabetes Mellitus in Subjects With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clinical gastroenterology and hepatology: the Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, **20**(3): 682–691.e8.

- MORENO-FERNÁNDEZ S, GARCÉS-RIMÓN M, VERA G, ASTIER J, LANDRIER J, MIGUEL M (2018). High Fat/High glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model. *Nutrients*, **10**: 1502.
- MORSHEDI M, SAGHAFI-ASL M, HOSSEINIFARD ES (2020). The potential therapeutic effects of the gut microbiome manipulation by synbiotic containing-Lactobacillus plantarum on neuropsychological performance of diabetic rats. *Journal of Translational Medicine*, **18**(1): 18.
- MUND RA, FRISHMAN WH (2013). Brown adipose tissue thermogenesis: β 3-adrenoreceptors as a potential target for the treatment of obesity in humans. *Cardiology in Review*, **21**(6): 265–269.
- MURATA C, WATANABE T, FURUYA H, SUGIOKA Y, MIKURUBE H, YOKOYAMA A, ATSUMI Y, MATSUOKA K, OKAZAKI I (2003). Aldehyde dehydrogenase 2 and β 3-adrenergic receptor gene polymorphisms: their association with elevated liver enzymes and metabolic syndrome. *Metabolism*, **52**(9): 1096–1101.
- MUSSO G, GAMBINO R, DE MICHIELI F, CASSADER M, RIZZETTO M, DURAZZO M, FAGÀ E, SILLI B, PAGANO G (2003). Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **37**(4): 909–916.
- NAHMIAS C, BLIN N, ELALOUF JM, MATTEI MG, STROSBERG AD, EMORINE LJ (1991). Molecular characterization of the mouse beta 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *The EMBO Journal*, **10**(12): 3721–3727.
- NAULT JC, COUCHY G, BALABAUD C, MORCRETTE G, CARUSO S, BLANC JF, BACQ Y, CALDERARO J, PARADIS V, RAMOS J, SCOAZEC JY, GNEMMI V, STURM N, GUETTIER C, FABRE M, SAVIER E, CHICHE L, LABRUNE P, SELVES J, WENDUM D, ... ZUCMAN-ROSSI J (2017). Molecular classification of hepatocellular adenoma associates with risk factors, bleeding, and malignant transformation. *Gastroenterology*, **152**(4): 880–894.e6.
- NAULT JC, FABRE M, COUCHY G, PILATI C, JEANNOT E, TRAN VAN NHIEU J, SAINT-PAUL MC, DE MURET A, REDON MJ, BUFFET C, SALENAVE S, BALABAUD C, PREVOT S, LABRUNE P, BIOULAC-SAGE P, SCOAZEC JY, CHANSON P, ZUCMAN-ROSSI J (2012). GNAS-activating mutations define a rare subgroup of inflammatory liver tumors characterized by STAT3 activation. *Journal of Hepatology*, **56**(1): 184–191.
- NILIIUS B (2007). TRP channels in disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1772**(8): 805–812.
- NILIIUS B, APPENDINO G (2011). Tasty and healthy TR(i)Ps. The human quest for culinary pungency. *Embo Reports*, **12**(11): 1094–1101.
- NILIIUS B, OWSIANIK G, VOETS T, PETERS JA (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiological Reviews*, **87**(1): 165–217.
- OSEI-HYIAMAN D, DEPETRILLO M, PACHER P, LIU J, RADAIEVA S, BÁTOKAI S, HARVEY-WHITE J, MACKIE K, OFFERTÁLER L, WANG L, KUNOS G (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, **115**(5): 1298–1305.

- OSEI-HYIAMAN D, LIU J, ZHOU L, GODLEWSKI G, HARVEY-WHITE J, JEONG WI, BÁTKAI S, MARSICANO G, LUTZ B, BUETTNER C, KUNOS G (2008). Hepatic CB1 receptor is required for development of diet-induced steatosis, dyslipidemia, and insulin and leptin resistance in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, **118**(9): 3160–3169.
- OMAGARÍ K, SUZUTA M, TANIGUCHI A, KUMAMOTO R, KOYAMA Y, FUKUDA A, SURUGA K, ICHIMURA-SHIMIZU M, TSUNEYAMA K (2020). A non-obese, diet-induced animal model of nonalcoholic steatohepatitis in Wistar/ST rats compared to Sprague-Dawley rats. *Clinical Nutrition Experimental*, **30**: 1-14.
- PANCHAL SK, BROWN L (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, **2011**: 351982.
- PAPPACHAN JM, BABU S, KRISHNAN B, RAVINDRAN NC (2017). Non-alcoholic fatty liver disease: A clinical update. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, **5**(4): 384-393.
- PARNELL JA, RAMAN M, RIOUX KP, REIMER RA (2012). The potential role of prebiotic fibre for treatment and management of non-alcoholic fatty liver disease and associated obesity and insulin resistance. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, **32**(5): 701–711.
- PARNELL JA, REIMER RA (2009). Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **89**: 1751-9.
- PASCHOS P, PALETAS K (2009). Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*, **13**(1): 9–19.
- PAXINOS G, WATSON C (2006). The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. *Elsevier*.
- PERDOMO CM, FRUHBECK G, ESCALADA J (2019). Impact of nutritional changes on nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, **11**(3): 677.
- PINGITORE P, ROMEO S (2019). The role of PNPLA3 in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1864**(6): 900–906.
- RAMIREZ-VÉLEZ R, IZQUIERDO M, CORREA-BAUTISTA JE, CORREA-RODRIGUEZ M, SCHMIDT-RIOVALLE J, GONZÁLEZ-JIMÉNEZ E, GONZÁLEZ-JIMÉNEZ K (2018). Liver fat content and body fat distribution in youths with excess adiposity. *Journal of Clinical Medicine*, **7**(12): 528.
- RAO M, GAO C, XU L, JIANG L, ZHU J, CHEN G, LAW B, XU Y. (2019). Effect of inulin-type carbohydrates on insulin resistance in patients with type 2 diabetes and obesity: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Diabetes Research*, **2019**: 5101423.
- RASMUSSEN SG, CHOI HJ, FUNG JJ, PARDON E, CASAROSA P, CHAE PS, DEVREE BT, ROSENBAUM DM, THIAN FS, KOBILKA TS, SCHNAPP A, KONETZKI I, SUNAHARA RK, GELLMA, SH, PAUTSCH A, STEYAERT J, WEIS WI, KOBILKA BK (2011). Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta(2)$ adrenoceptor. *Nature*, **469**(7329): 175–180.

- RASMUSSEN SG, DEVREE BT, ZOU Y, KRUSE AC, CHUNG KY, KOBILKA TS, THIAN FS, CHAE PS, PARDON E, CALINSKI D, MATHIESEN JM, SHAH ST, LYONS JA, CAFFREY M, GELLMAN SH, STEYAERT J, SKINIOTIS G, WEIS WI, SUNAHARA RK, KOBILKA BK (2011). Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, **477**(7366): 549–555.
- RICHARD JE, LÓPEZ-FERRERAS L, CHANCLÓN B, EEROLA K, MICALLEF P, SKIBICKA KP, WERNSTEDT ASTERHOLM I (2017). CNS β_3 -adrenergic receptor activation regulates feeding behavior, white fat browning, and body weight. *American journal of physiology. Endocrinology And Metabolism*, **313**(3): E344–E358.
- RIO DC, ARES MJR, HANNON GJ, NILSEN TW (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, **2010**(6): pdb.prot5439.
- RIZZO NS, SABATÉ J, JACELDO-SIEGL K, FRASER GE (2011). Vegetarian dietary patterns are associated with a lower risk of metabolic syndrome: the adventist health study 2. *Diabetes Care*, **34**(5): 1225–1227.
- RODRIGUEZ J, HIEL S, NEYRINCK AM, LE ROY T, POTGENS SA, LEYROLLE Q, PACHIKIAN, BD, GIANFRANCESCO MA, CANI PD, PAQUOT N, CNOP M, LANTHIER N, THISSEN JP, BINDELS LB, DELZENNE NM (2020). Discovery of the gut microbial signature driving the efficacy of prebiotic intervention in obese patients. *Gut*, **69**(11): 1975–1987.
- ROJO ML, SODERSTROM I, OLSSON T, FOWLER CJ (2013). Changes in cannabinoid CB(1) receptor functionality in the female rat prefrontal cortex following a high fat diet. *Life Sciences*, **92**(13): 757–762.
- ROMEO S, KOZLITINA J, XING C, PERTSEMLIDIS A, COX D, PENNACCHIO LA, BOERWINKLE E, COHEN JC, HOBBS HH (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics*, **40**(12): 1461–1465.
- ROSSI F, BELLINI G, ALISI A, ALTERIO A, MAIONE S, PERRONE L, LOCATELLI F, MIRAGLIA DEL GIUDICE E, NOBILI V (2012). Cannabinoid receptor type 2 functional variant influences liver damage in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Plos One*, **7**(8): e42259.
- ROSSI F, BELLINI G, ALISI A, ALTERIO A, MAIONE S, PERRONE L, LOCATELLOI F, MIRAGLIA DEL GIUDICE E, NOBILI V (2012). Cannabinoid receptor type 2 functional variant influences liver damage in children with non-alcoholic fatty liver disease. *Plos One*, **7**(8): e42259.
- SAKAMOTO Y, ONIKI K, KUMAGAE N, MORITA K, OTAKE K, OGATA Y, SARUWATARI J (2019). Beta-3-adrenergic receptor rs4994 Polymorphism is a potential biomarker for the development of nonalcoholic fatty liver disease in overweight/obese individuals. *Disease Markers*, **2019**: 4065327.
- SALMEAN YA (2017). Acute fiber supplementation with inulin-type fructans curbs appetite sensations: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Food & Nutrition Research*, **61**(1): 1341808.

- SATTA V, SCHERMA M, PISCITELLI F, USAI P, CASTELLI MP, BISOGNO T, FRATTA W, FADDA P (2018). Limited Access to a High Fat Diet Alters Endocannabinoid Tone in Female Rats. *Frontiers in Neuroscience*, **12**: 40.
- SCHENA G, CAPLAN MJ (2019). Everything you always wanted to know about β 3-AR* (* But were afraid to ask). *Cells*, **8**(4): 357.
- SCHIAVON FP, MARQUES A, CARRARA MA, DE SOUZA HM, SCHAMBER CR, CURI R, BAZOTTE RB (2014). Pivotal role of cAMP in the activation of liver glycogen breakdown in high-fat diet fed mice. *Life Sciences*, **109**(2): 111–115.
- SCHULZ P, HRYHOROWICZ S, RYCHTER AM, ZAWADA A, SŁOMSKI R, DOBROWOLSKA A, KRELA-KAŻMIERCZAK I (2021). What role does the endocannabinoid system play in the pathogenesis of obesity?. *Nutrients*, **13**(2): 373.
- SEAMAN DR (2013). Weight gain as a consequence of living a modern lifestyle: a discussion of barriers to effective weight control and how to overcome them. *Journal of Chiropractic Humanities*, **20**(1): 27–35.
- SHI D, ZHAN X, YU X, JIA M, ZHANG Y, YAO J, HU X, BAO Z (2014). Inhibiting CB1 receptors improves lipogenesis in an in vitro non-alcoholic fatty liver disease model. *Lipids in Health and Disease*, **13**: 173.
- SHIMADA M, KAWAHARA H, OZAKI K, FUKURA M, YANO H, TSUCHISHIMA M, TSUTSUMI M, TAKASE S (2007). Usefulness of a combined evaluation of the serum adiponectin level, HOMA-IR, and serum type IV collagen 7S level to predict the early stage of nonalcoholic steatohepatitis. *The American Journal of Gastroenterology*, **102**(9): 1931–1938.
- SIEGMUND SV, QIAN T, DE MINICIS S, HARVEY-WHITE J, KUNOS G, VINOD KY, HUNGUND B, SCHWABE RF (2007). The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cells via mitochondrial reactive oxygen species. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **21**(11): 2798–2806.
- SIEGMUND SV, SCHWABE RF (2008). Endocannabinoids and liver disease. II. Endocannabinoids in the pathogenesis and treatment of liver fibrosis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **294**(2): G357–362.
- SLEETH ML, THOMPSON EL, FORD HE, ZAC-VARGHESE SE, FROST G (2010). Free fatty acid receptor 2 and nutrient sensing: a proposed role for fibre, fermentable carbohydrates and short-chain fatty acids in appetite regulation. *Nutrition Research Reviews*, **23**(1): 135–145.
- SOOKOIAN S, PIROLA CJ (2011). Meta-analysis of the influence of I148M variant of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) on the susceptibility and histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **53**(6): 1883–1894.
- SU X, PENG D (2020). The exchangeable apolipoproteins in lipid metabolism and obesity. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, **503**: 128–135.
- SUGATANI J, OSABE M, WADA T, YAMAKAWA K, YAMAZAKI Y, TAKAHASHI T, IKARI A, MIWA M (2008). Comparison of enzymatically synthesized inulin, resistant maltodextrin and

clofibrate effects on biomarkers of metabolic disease in rats fed a high-fat and high-sucrose (cafeteria) diet. *European Journal of Nutrition*, **47**(4): 192–200.

SUGATANI J, SADAMITSU S, WADA T, YAMAZAKI Y, IKARI A, MIWA M (2012). Effects of dietary inulin, statin, and their co-treatment on hyperlipidemia, hepatic steatosis and changes in drug-metabolizing enzymes in rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *Nutrition & Metabolism*, **9**(1): 23.

SUGATANI J, WADA T, OSABE M, YAMAKAWA K, YOSHINARI K, MIWA M (2006). Dietary inulin alleviates hepatic steatosis and xenobiotics-induced liver injury in rats fed a high-fat and high-sucrose diet: association with the suppression of hepatic cytochrome P450 and hepatocyte nuclear factor 4alpha expression. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, **34**(10): 1677–1687.

TAKAHASHI Y, SOEJIMA Y, FUKUSATO T (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, **18**(19): 2300–2308.

TAM J, GODLEWSKI G, EARLEY BJ, ZHOU L, JOURDAN T, SZANDA G, CINAR R, KUNOS G (2014). Role of adiponectin in the metabolic effects of cannabinoid type 1 receptor blockade in mice with diet-induced obesity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **306**(4): E457–E468.

TAM J, SZANDA G, DRORI A, LIU Z, CINAR R, KASHIWAYA Y, REITMAN ML, KUNOS G (2017). Peripheral cannabinoid-1 receptor blockade restores hypothalamic leptin signaling. *Molecular Metabolism*, **6**(10): 1113–1125.

TILG H, MOSCHEN AR, RODEN M (2017). NAFLD and diabetes mellitus. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **14**(1): 32–42.

TOSHIMITSU K, MATSUURA B, OHKUBO I, NIIYA T, FURUKAWA S, HIASA Y, KAWAMURA M, EBIHARA K, ONJI M (2007). Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, **23**(1): 46–52.

TRÉPO E, NAHON P, BONTEMPI G, VALENTI L, FALLETI E, NISCHALKE HD, HAMZA S, CORRADINI SG, BURZA MA, GUYOT E, DONATI B, SPENGLER U, HILLON P, TONIUTTO P, HENRION J, FRANCHIMONT D, DEVIÈRE J, MATHURIN P, MORENO C, ROMEO S, DELTENRE P (2014). Association between the PNPLA3 (rs738409 C>G) variant and hepatocellular carcinoma: Evidence from a meta-analysis of individual participant data. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **59**(6): 2170–2177.

TSURUMAKI M, KOTAKE M, IWASAKI M, SAITO M, TANAKA K, AW W, FUKUDA S, TOMITA M (2015). The application of omics technologies in the functional evaluation of inulin and inulin-containing prebiotics dietary supplementation. *Nutrition & Diabetes*, **5**(11): e185.

TUTUNCHI H, OSTADRAHİMİ A, SAGHAFI-ASL M, MALEKI V (2019). The effects of oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-α agonist, on risk factors for NAFLD: A systematic review. *Obesity Reviews*, **20**(7): 1057-1069.

- VALENTI L, AL-SERRI A, DALY AK, GALMOZZI E, RAMETTA R, DONGIOVANNI P, NOBILI V, MOZZI E, ROVIARO G, VANNI E, BUGIANESI E, MAGGIONI M, FRACANZANI AL, FARGION S, DAY CP (2010). Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **51**(4): 1209–1217.
- VALENTI L, AL-SERRI A, DALY AK, GALMOZZI E, RAMETTA R, DONGIOVANNI P, NOBILI V, MOZZI E, ROVIARO G, VANNI E, BUGIANESI E, MAGGIONI M, FRACANZANI AL, FARGION S, DAY CP (2010). Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **51**(4): 1209–1217.
- VAN HERCK MA, VONGHIA L, FRANCQUE SM (2017). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease-a starter's guide. *Nutrients*, **9**(10): 1072.
- VANCELLS LUJAN P, VIÑAS ESMEL E, SACANELLA MESEGUER E (2021). Overview of non-alcoholic fatty liver disease (nafld) and the role of sugary food consumption and other dietary components in its development. *Nutrients*, **13**(5): 1442.
- VERNON G, BARANOVA A, YOUNOSSI ZM (2011). Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **34**(3): 274–285.
- VILEIGAS DF, DE DEUS AF, DA SILVA DC, DE TOMASI LC, DE CAMPOS DH, ADORNI CS, DE OLIVEIRA SM, SANT'ANA PG, OKOSHI K, PADOVANI CR, CICOGNA AC (2016). Saturated high-fat diet-induced obesity increases adenylate cyclase of myocardial β -adrenergic system and does not compromise cardiac function. *Physiological Reports*, **4**(17): e12914.
- WADA T, SUGATANI J, TERADA E, OHGUCHI M, MIWA M (2005). Physicochemical characterization and biological effects of inulin enzymatically synthesized from sucrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(4): 1246–1253.
- WAHLANG B, MCCLAIN C, BARVE S, GOBEJISHVILI L (2018). Role of cAMP and phosphodiesterase signaling in liver health and disease. *Cellular Signalling*, **49**: 105–115.
- WALSTON J, SILVER K, BOGARDUS C, KNOWLER WC, CELI FS, AUSTIN S, MANNING B, STROSBURG AD, STERN MP, RABEN N (1995). Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. *The New England Journal of Medicine*, **333**(6): 343–347.
- WANDERS AJ, VAN DEN BORNE JJ, DE GRAAF C, HULSHOF T, JONATHAN MC, KRISTENSEN M, MARS M, SCHOLS HA, FESKENS EJ (2011). Effects of dietary fibre on subjective appetite, energy intake and body weight: a systematic review of randomized controlled trials. *Obesity Reviews: an Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, **12**(9): 724–739.
- WANG P, WU P, SIEGEL MI, EGAN RW, BILLAH MM (1994). IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **153**(2): 811–816.
- WANG Z, LI V, CHAN GC, PHAN T, NUDELMAN AS, XIA Z, STORM DR (2009). Adult type 3 adenylyl cyclase-deficient mice are obese. *Plos One*, **4**(9): e6979.

- WATKINS BA, KIM J. (2015). The endocannabinoid system: directing eating behavior and macronutrient metabolism. *Frontiers in Psychology*, 5: 1506.
- WEITKUNAT K, SCHUMANN S, NICKEL D, HORNEMANN S, PETZKE KJ, SCHULZE MB, PFEIFFER AF, KLAUS S (2017). Odd-chain fatty acids as a biomarker for dietary fiber intake: novel pathway for endogenous production from propionate. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(6): 1544–1551.
- WEITKUNAT K, SCHUMANN S, PETZKE KJ, BLAUT M, LOH G, KLAUS S (2015). Effects of dietary inulin on bacterial growth, short-chain fatty acid production and hepatic lipid metabolism in gnotobiotic mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(9): 929–937.
- WIDÉN E, LEHTO M, KANNINEN T, WALSTON J, SHULDINER AR (1995). Groop L. C. Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *New England Journal of Medicine*, 333(6): 348–352.
- WILLEMS E, LEYNS L, VANDESOMPELE J (2008). Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Analytical Biochemistry*, 379(1): 127–129.
- WILLIAMS CD, STENGEL J, ASIKE MI, TORRES DM, SHAW J, CONTRERAS M, LANDT CL, HARRISON SA (2011). Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology*, 140(1): 124–131.
- WILSON PA, GARDNER SD, LAMBIE NM, COMMANS SA, CROWTHER DJ (2006). Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *Journal of Lipid Research*, 47(9): 1940–1949.
- XIA Y, WANG X, ZHANG S, ZHANG Q, LIU L, MENG G, WU H, BAO X, GU Y, SUN S, WANG X, ZHOU M, JIA Q, SONG K, W, Q, NIU K, ZHAO Y (2019). Daily tea drinking is not associated with newly diagnosed non-alcoholic fatty liver disease in Chinese adults: the Tianjin chronic low-grade systemic inflammation and health cohort study. *Nutrition Journal*, 18(1): 71.
- YAN Z, FAN R, YIN S, ZHAO X, LIU J, LI L, ZHANG W, GE L (2015). Protective effects of Ginkgo biloba leaf polysaccharide on nonalcoholic fatty liver disease and its mechanisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80: 573–580.
- YASUTAKE K, KOHJIMA M, KOTOH K, NAKASHIMA M, NAKAMUTA M, ENJOJI M (2014). Dietary habits and behaviors associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(7): 1756–1767.
- YOSHIDA T, SAKANE N, UMEKAWA T, SAKAI M, TAKAHASHI T, KONDO M (1995). Mutation of β_3 -adrenergic-receptor gene and response to treatment of obesity. *Lancet*, 346(8987): 1433–1434.

- YOUNOSSI Z, ANSTEE QM, MARIETTI M, HARDY T, HENRY L, ESLAM M, GEORGE J, BUGIANESI E (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, **15**(1): 11–20.
- YOUSSEF DA, EL-FAYOUMI HM, MAHMOUD MF (2019). Beta-caryophyllene alleviates diet-induced neurobehavioral changes in rats: The role of CB2 and PPAR- γ receptors. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, **110**: 145–154.
- ZAMBERLETTI E, PISCITELLI F, DE CASTRO V, MURRU E, GABAGLIO M, COLUCCI P, FANALI C, PRINI P, BISOGNO T, MACCARRONE M, CAMPOLONGO P, BANNI S, RUBINO T, PAROLARO D (2017). Lifelong imbalanced LA/ALA intake impairs emotional and cognitive behavior via changes in brain endocannabinoid system. *Journal of Lipid Research*, **58**(2): 301–316.
- ZELBER-SAGI S, AZAR S, NEMIROVSKI A, WEBB M, HALPERN Z, SHIBOLET O, TAM J (2017). Serum levels of endocannabinoids are independently associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, **25**(1): 94–101.
- ZELBER-SAGI S, NITZAN-KALUSKI D, GOLDSMITH R, WEBB M, BLENDIS L, HALPERN Z, OREN R (2007). Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *Journal of Hepatology*, **47**(5): 711–717.
- ZHANG L, LI G, SHE Y, ZHANG Z (2021). Low levels of spexin and adiponectin may predict insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver. *Practical Laboratory Medicine*, **24**: e00207.
- ZHANG M, RUWE D, SAFFARI R, KRAVCHENKO M, ZHANG W (2020). Effects of TRPV1 Activation by Capsaicin and Endogenous N-Arachidonoyl Taurine on Synaptic Transmission in the Prefrontal Cortex. *Frontiers in Neuroscience*, **14**: 91.
- ZHANG S, GAN S, ZHANG Q, LIU L, MENG G, YAO Z, WU H, GU Y, WANG Y, ZHANG T, WANG X, SUN S, WANG X, ZHOU M, JIA Q, SONG K, QI L, NIU K (2022). Ultra-processed food consumption and the risk of non-alcoholic fatty liver disease in the tianjin chronic low-grade systemic inflammation and health cohort study. *International Journal of Epidemiology*, **51**(1): 237–249.
- ZHAO S, LI N, ZHU Y, STRAUB L, ZHANG Z, WANG MY, ZHU Q, KUSMINSKI CM, ELMQUIST JK, SCHERER PE (2020). Partial leptin deficiency confers resistance to diet-induced obesity in mice. *Molecular Metabolism*, **37**: 100995.
- ZHONG J, MINASSI A, PRENEN J, TAGLIALATELA-SCAFATI O, APPENDINO G, NILIUS B (2011). Umbellulone modulates TRP channels. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, **462**(6): 861–870.
- ZHU H, GE K, LU J, JIA C (2020). Downregulation of GNAI3 promotes the pathogenesis of methionine/choline-deficient diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. *Gut and Liver*, **14**(4): 492–499.
- ZINGG JM, HASAN ST, NAKAGAWA K, CANEPA E, RICCIARELLI R, VILLACORTA L, AZZI A, MEYDANI M (2017). Modulation of cAMP levels by high-fat diet and curcumin and regulatory effects on CD36/FAT scavenger receptor/fatty acids transporter gene expression. *BioFactors (Oxford, England)*, **43**(1): 42–53.

ZOU Y, LI J, LU C, WANG J, GE J, HUANG Y, ZHANG L, WANG Y (2006). High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sciences*, **79**(11): 1100–1107.

ZUO H, SHI Z, YUAN B, DAI Y, PAN X, WU G, HUSSAIN A (2013). Dietary patterns are associated with insulin resistance in Chinese adults without known diabetes. *The British Journal of Nutrition*, **109**(9): 1662–1669.



EKLER



EK-1: Etik Kurul Onayı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 05/02/2020
TOPLANTI NO : 2020-3
DOSYA NO : 2020-14
KARAR NO : 2020-3-20

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Funda Pınar ÇAKIROĞLU'nun yaptığı; araştırmacı olarak Arş. Gör. İsmail Mücahit ALPTEKİN ve Uzm. Vet. Hek. Atilla İŞGÖREN'in katıldığı "Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Wistar Ratlarında İnülin Desteginin Endokanabinoid Düzeyi, Karaciğer Yağlanması ve İnsülin Direnci Üzerine Etkileri" başlıklı çalışma Kurulumuzca değerlendirilmiş ve söz konusu çalışmanın Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 25
Geçerlilik Süresi : 01/09/2020-01/07/2021

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 / 2101 Faks: 0 (312) 212 60 49

Doç. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Dentoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K	
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	Oylamaya katılmadı.
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

EK-2: TÜBİTAK ONAY YAZISI



T.C.
TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI
Araştırma Destek Programları Başkanlığı

Sayı : B.14.2.TBT.0.06.03.02-161-86427
Konu : 120S225 Numaralı Proje Karar Yazısı

19/06/2020

Sayın Prof. Dr. Funda Rıkar ÇAKIROĞLU

"1000 Hızlı Destek Programı" kapsamında Kurumunuza sunulmuş olduğunuz 120S225 numaralı ve "Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Wistar Ratlarında İnsülin Desteğinin Endokanabinoid Düzeyi, Karaciğer Yağlanması Ve İnsülin Direnci Üzerine Etkileri" başlıklı projenize ilişkin değerlendirme süreci tamamlanmıştır.

Desteklemesine karar verilen proje önerinizin ilgili mevzuat çerçevesinde, mali ve benzeri konularda değerlendirme çalışmalarına başlanmıştır. Süreç tamamlanırken projeye ait sözleşme ve diğer belgeler imzalanmak üzere tarafınıza gönderilecektir.

Çalışmalarınızda başarılar diler, saygılar sunarım.

Doç. Dr. Nazife Selcan TÜRKER
Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu
(SBAĞ)
Grup Koordinatörü

PANEL PUAN SEVYESİ: B

A: Çok İyi B: İyi C: Orta D: İyi Değil E: Yetersiz

Panel toplam puanı A ve B seviyesinde olan projeler desteklenmiştir.