T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METABOLİK SENDROM OLUŞTURULMUŞ RATLARIN KARACİĞER, BEYİN VE SERUMLARINDA SALUSİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Arş. Grv. Cihan ÇİTİL

Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Genel Biyoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vahit KONAR

İkinci Danışman : Doç. Dr. Süleyman AYDIN

ARALIK-2012

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METABOLİK SENDROM OLUŞTURULMUŞ RATLARIN KARACİĞER, BEYİN VE SERUMLARINDA SALUSİN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Cihan ÇİTİL
(06210203)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20/11/ 2012
Tezin Savunulduğu Tarih : 10/12/ 2012

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Vahit KONAR (SİNOP. Ü)

Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Ömer MUNZUROĞLU (F.Ü)

Prof. Dr. Yusuf ÖZKAN (F. Ü)

Prof. Dr. Fikret KARATAŞ (F.Ü)

Doç. Dr. Orhan KANKAVİ (M.A.K.Ü)

ARALIK-2012

ÖNSÖZ

Metabolik sendrom (MetS) içinde yaşadığımız bilgi çağının en önemli sağlık sorunudur. Etiyopatolojisinde peptid yapılı hormonlar dahil birçok faktör rol oynamaktadır. Bu çalışmada da Mets'in etiyopatolojisinde salusin-α ve salusin-β'nın rolleri araştırıldı.

Çalışmalarım esnasında bana her konuda yardımlarını, ilgi ve alakasını esirgemeyerek yanımda olan eşsiz insan danışman hocam sayın Doç.Dr. Vahit KONAR'a teşekkürü bir borç bilirim. Aynı zamanda bu tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde ilk günden itibaren babacan tavırlarıyla kesintisiz olarak yanımda olan ve bana her türlü desteği sağlayarak bilimsel anlamda gelişmeme tam destek olan ikinci danışman hocam sayın Doç.Dr. Süleyman AYDIN hocama şükranlarımı sunarım. Ayrıca sayın Dekanım Prof. Dr. A. Kadri ÇETİN, sayın bölüm başkanım A. Harun EVREN ve Yrd. Doç. Dr. Yaşar KIRAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yine tezimin her aşamasında özellikle biyokimyasal ve immünohistokimyasal analizlerin yapılması ve değerlendirilmesinde bana yardımcı olan engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Yrd.Doç.Dr. İbrahim ŞAHİN ve Prof.Dr. İ. Hanifi ÖZERCAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Tezimde gerekli olan kimyasal ve kitleri şahsıma sağlayarak desteklerini esirgemeyen Op. Dr. Suna AYDIN ve Uzm. Dr. Ahmet ÇELİK'e ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım. Tezimin yazımı esnasında engin fikirlerinden faydalandığım çok değerli hocalarım Prof.Dr. Ömer MUNZUROĞLU, Prof.Dr. Yusuf ÖZKAN, Doç.Dr. A. Orhan GÖRGÜLÜ, Yrd.Doç.Dr. Tuncay KULOĞLU, Yrd.Doç.Dr Aziz AKSOY ve Yrd.Doç.Dr Fethi DAĞDELEN'e ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın bütün evresinde her şartta yanımda olan anneme, babama, eşim Seda ÇİTİL ve bize huzur veren oğlum Osman Sarp'a şükranlarımı sunmaktan onur duyarım.

Cihan ÇİTİL

ELAZIĞ-2012

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ II
İÇİNDEKİLER III
ÖZET VI
SUMMARY VII
ŞEKİLLER LİSTESİ VIII
TABLOLAR LİSTESİ IX
KISALTMALAR LİSTESİ X
1. GİRİŞ 1
1.1. Metabolik Sendrom 1
1.1.1. Metabolik Sendromun Ülkelere Göre Yaygınlığı 2
1.1.2. Metabolik Sendromun Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkileri 3
1.1.3. Metabolik Sendrom Tanımı Yapan Çalışma Grupları 6
1.1.4. ATP III Kriterleri 6
1.1.5. Metabolik Sendrom Oluşturma Modelleri 8
1.1.5.1. Fruktoz (%60-70 kcal) 8
1.1.5.2. Yüksek Doymuş Yağ ve Kolesterol (%0.05-1) 8
1.1.5.3. Yüksek Doymuş Yağ ve Yaklaşık % 0.3'lük Kolesterol 8
1.1.5.4. Yağ (%45-60 kcal) ve Diğer Yağ Kaynakları 9
1.1.5.5. Doygunluğu Yüksek Yağ, Kolesterol (%1) ve Kolik Asit (% 0.5) 9
1.1.5.6. Yağ (%10-58 Kcal), Diğer Yağ ve Karbohidrat Kaynakları 10
1.1.5.7. Kolesterol (%0.1-1.25) 10
1.1.5.8. Yağa (% 48 kcal) Yem Eklenmesi 10
1.1.5.9. Sodyum Klorür (% 8) 11
1.1.5.10. Yağ (%32 kcal) 11
1.1.5.11. Yağ (%30-60 kcal) ve Diğer Yağ Kaynakları 12
1.1.5.12. Sukroz (%60-70 kcal) 12
1.1.5.13. Fruktoz (%60) 13
1.1.5.14. İçme Sularına Fruktoz (%10) 13
1.1.6. Diyete Fruktoz Eklenmesinin Biyokimyasal ve Fizyolojik Etkileri 13
1.1.7. Metabolik Sendrom Modellerinin Karşılaştırılması 14
1.1.8. Fruktozun Metabolik Sendrom Oluşturma Mekanizması 14
1.2. Beyin ve Karaciğer Dokuları 15

1.2.1. Beyin 15
1.2.2. Karaciğer 17
1.3. Salusin'lere Genel Bakış 20
1.3.1. Salusin-α 20
1.3.2. Salusin-β 22
1.3.3. Salusin-α ve Salusin-β'nın Amino Asit Dağılımları 23
1.3.4. Salusin-α ve Salusin-β'nın Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkileri 24
2. MATERYAL VE METOD 25
2.1. Deney Hayvanları ve Diyet Protokolü 25
2.2. Sıçanlarda Vücut Kitle İndeksinin Hesaplanması 25
2.3. Sıçanlarda MetS Tanı Kriterleri 26
2.4. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması 26
2.5. Alet, Cihaz ve Kimyasallar 27
2.5.1. Kullanılan Alet, Cihaz ve Sarf Malzemeler 27
2.5.2. Kullanılan Kimyasallar 29
2.5.3. Kullanılan Kit ve Antikorlar 29
2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi 30
2.7. ELISA Yönteminin İlkesi 30
2.8. Salusinlerin Analizleri 30
2.8.1. Salusin-α Düzeyi 31
2.8.1.1. Hazırlık 31
2.8.1.2. Analiz 32
2.8.2. Salusin-β Düzeyi 33
2.8.2.1. Hazırlık 33
2.8.2.2. Analiz 35
2.9. İmmünohistokimyasal Analizler 36
2.9.1. İmmünohistokimyasal Yöntemin İlkesi 36
2.9.2. Deneyin Yapılışı 37
2.9.2.1. Hazırlık 37
2.9.2.2. Boyama 37
2.10. İstatistiksel Analizler 39
3. BULGULAR 41
3.1. Vücut Kitle İndeksi Değişimleri 41

3.2. Biyokimyasal Parametreler 43
3.3. Salusin-α ve Salusin-β Değişimleri 44
3.3.1. Salusin-α ve Salusin-β Düzeyleri 45
3.4. İlişki Analizleri 53
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA 55
4.1. Öneriler 64
5. KAYNAKLAR 65
ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

Metabolik sendrom (MetS) dünya ve ülkemiz genelinde hızla yaygınlaşan, altında yatan nedenler henüz tam olarak bilinmemesine karşın prediyabet, diyabet, abdominal obezite, kan yağı düzeylerinde bozukluk ve yüksek kan basıncı gibi birçok faktörün kümelendiği metabolik bir bozukluktur. Bu MetS çalışması; kan basıncının regülasyonu ve enerji homeostasisinde rolü olan salusin-α (Sal-α) ve salusin-β (Sal-β) hormonlarının beyin ve karaciğer dokusundaki ekspresyonlarının MetS'e bağlı olarak nasıl değiştiğini ve bu değişimlerin dolaşımdaki Sal-α ve Sal-β miktarlarına nasıl yansıdığını ve ayrıca MetS'e bağlı olarak lipit profili, glukoz ve ürik asit konsantrasyonlarının nasıl değiştiğini ortaya koymak için dizayn edildi. Çalışmaya 35–40 günlük 14 adet *Sprague-Dawley* türü erkek sıçan dahil edildi. Sıçanlar kontrol ve fruktozla MetS oluşturulacak gruplar olmak üzere rastgele ikiye ayrılarak 4 kafes içerisine yerleştirildi. Üç ay boyunca kontrol grubu standart sıçan yemi ile, MetS grubu ise, standart sıçan yemine ek olarak yüzde 10'luk fruktozlu suyla *ad libitum* olarak beslendi. Serum ve doku (beyin ve karaciğer) supernatantlarında, Sal-α ve Sal-β konsantrasyonları ELISA yöntemi ile analiz edilirken, beyin ve karaciğer dokularının hormon (Sal-α ve Sal-β) ekspresyonları immünohistokimyasal olarak boyandı. Biyokimyasal parametreler otoanalizör ile tayin edildi. MetS'e bağlı olarak hem serum hem de beyin ve karaciğer doku süpernatantlarında Sal-α ve Sal-β değişimlerinin azaldığı rapor edildi. Sal-α ve Sal-β'nin beyinde epitelyum tabakası ve hipotalamusun supraoptik nükleus hücrelerinde, karaciğerde ise hepatosit hücreleri tarafından üretildiği immunohistokimyasal olarak gösterildi. Salusin eksprese eden hücrelerde immuhistokimyasal boyanma şiddetinin MetS'le azaldığı saptandı. MetS gruplarında açlık serum glukoz, ALT, GGT, trigliserid, LDL-K, total kolesterol ve ürik asit düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı arttığı, HDL-K düzeylerinin ise anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Sonuçlarımıza göre MetS'e bağlı olarak beyin ve karaciğer dokularında salusin ekspresyonlarının azalması serum havuzundaki miktarlarının azalmasına neden olmaktadır. Dolaşımda salusin miktarlarının azalışının; bir yandan foam hücre oluşumları artışına neden olduğu, diğer yandan kan basıncı regülasyonu bozulduğundan MetS'in kriterlerinden biri olan hipertansiyona yol açtığı düşünülmektedir. Salusinlerin replasman yoluyla fizyolojik sınırlara çıkarılmasının MetS'in neden olduğu olumsuz etkilerden korunmada yararlı olacağı kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: Metabolik sendrom**,** Salusin-α, Salusin-β, İmmünohistokimya, karaciğer ve beyin

SUMMARY

Metabolic syndrome (MetS) is a metabolical disorder which has been getting more and more widespread throughout the world and in our country and although the underlying reasons of the illness have not been totally revealed yet. In this disorder, various factors such as prediabetes, diabetes, abdominal obesity, irregularity in blood fat level and high blood pressure are grouped together. This MetS study has been designed in order to reveal the expressions of hormones salusin-α (Sal-α) and salusin-β (Sal-β), which have a role in the regulation of blood pressure and energy homeostasis, in the tissue of the brain and liver vary depending on MetS and how these changes reflect on the amounts of Sal-α and Sal-β in the circulation. Besides depending on how the concentrations of MetS lipit profile, glucose and uric acid varies. *Sprague-Dawley* species of 35-40-day 14 male rats, were included in the study. The rats were randomly divided into two groups as control and fructose MetS and put into 4 cages. For three months, the control group was fed with the regular rat food whereas the MetS group was fed with an additional 10% of water with fructose standart as *ad libitum*. While in serum and tissue (brain and liver) supernatants, Sal-α and Sal-β concentrations were analysed by ELISA method, the hormonal (Sal-α and Sal-β) expressions of brain and liver tissues were coloured in a immünohistochemical way. Biochemical parameters were assigned by aoutoanalyser. It was reported that depending on MetS Sal-α and Sal-β changes declined both in serum and brain and liver tissue superntants. It was shown in a immuhistochemical way that Sal-α and Sal-β is produced by epitelyum layer in brain and supraoptik nucleus cells in hipotalamus, and hepatosit cells in the liver. It has been found out that the process of being coloured is less intense in the cells expressing Salusin. There is a statistically considerable increase in MetS groups hunger serum glucose, ALT, GGT, triglyceride, LDL-K, total cholesterol and uric acid levels and a considerable decline in HDL-K levels. According to our results, depending on MetS, the decrease in the salusin expressions in brain and liver lead to their amounts in serum pool. It is believed that the fall in salusin amounts in the circulation lead to the formation of foam cells and since the blood pressure regulation is disrupted it also results in hypertension, which is one of the criteria of MetS. We believe that through replecement, Salusins' pulling physiological levels up will be effective in getting protected from the harmful effects of MetS.

Keywords: Metabolic syndrome**,** Salusin-α, Salusin-β, immünohistochemistry, liver and brain

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Metabolik sendromun fizyolojik ve biyokimyasal etkileri 5
Şekil 1.2. Çalışma gruplarına göre metabolik sendrom tanı kriterleri 7
Şekil 1.3. Fruktozla MetS oluşma sürecinin başlıca ana mekanizması 16
Şekil 1.4. Salusin-α'nın amino asit dizilimi (28 aa) 21
Şekil 1.5. Salusin-β'nın amino asit dizilimi (20 aa) 22
Şekil 2.1. Sıçanlarda vücut kitle indeksi formülü.....26
Şekil 2.2. Salusin-α standart çözeltisinin hazırlanması 31
Şekil 2.3. Salusin-β standart çözeltisinin hazırlanması 34
Şekil 3.1. Sıçanların 12. hafta sonunda örnek görünümleri 41
Şekil 3.2. Sıçanların diyet öncesi ve sonrası vücut kitle indeksi.....43
Şekil 3.3. Serum salusin-α ve -β değişimleri 46
Şekil 3.4. Beyin salusin-α değişimleri 46
Şekil 3.5. Beyin salusin-β değişimleri 47
Şekil 3.6. Karaciğer salusin-α değişimleri 47
Şekil 3.7. Karaciğer salusin-β değişimleri 48
Şekil 3.8. Beyin salusin-α ekspresyonlarının immünohistokimyası.....49
Şekil 3.9. Beyin salusin-β ekspresyonlarının immünohistokimyası.....50
Şekil 3.10. Karaciğer salusin-α ekspresyonlarının immünohistokimyası.....51
Şekil 3.11. Karaciğer salusin-β ekspresyonlarının immünohistokimyası.....52

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Sıçanların içme sularına F10 veya yemlerine F60 katılmasının biyokimyasal ve fizyolojik sonuçları 13
Tablo 1.2. Deneysel metabolik sendrom modellerinin karşılaştırılması.....14
Tablo 1.3. Salusin-α ve salusin-β'nın amino asit dağılımı ve % oranları 23
Tablo 1.4. Salusin-α ve salusin-β'nın fizyolojik ve biyokimyasal etkilerinin karşılaştırılması.....24
Tablo 2.1. Kullanılan Kit ve Antikorlar 29
Tablo 3.1. Sıçanların deney sürecinde vücut kitle indeksi değişimleri.....42
Tablo 3.2. Biyokimyasal parametrelerin serum düzeyleri.....44
Tablo 3.3. Kitlerin sıçan serumlarındaki hormonların ölçüm karakteristikleri 44
Tablo 3.4. Kitlerin doku süpernatantlarındaki hormonların ölçüm karakteristikleri 45
Tablo 3.5. Metabolik sendromda salusin-α ve salusin-β ekspresyonlarının değişim oranları 45
Tablo 3.6. Salusin-α ve salusin-β ekspresyonlarının dağılımı. 53
Tablo 3.7. Salusin-α ve salusin-β ekspresyonlarının immünohistokimyasal değerlendirmesi.....53
Tablo 3.8. Kontrol grubu ilişkileri 54
Tablo 3.9. Metabolik sendrom grubu ilişkileri 54

KISALTMALAR LİSTESİ

AACE : American Association of Clinical Endocrinologists (Amerikan Klinik Endokrinologları Derneği)

ABC : Avidin-Biotin-Peroxidase Complex

ACAT : Cholesterol Acyl-Transferase (Acyl-CoA)

AEC : 3-Amino-9-Ethyl Carbazole

AHA / NHLBI : American Heart Association / National Heart, Lung, and Blood Institute (Amerikan Kalp Derneği / Ulusal Kalp, Akciğer ve Kan Enstitüsü)

ALP : Alkalen Fosfataz

ALT : Serum Alanin Amino Transferaz

APG : Açlık Plazma Glukoz

ASG : Açlık Serum Glukoz

ASİ : Açlık Serum İnsülin

AST : Serum Aspartat Amino Transferaz

ATP III **:** Erişkin Tedavi Paneli-III

BAG : Bozulmuş Açlık Glukozu

BÇ : Bel Çevresi

BGT : Bozulmuş Glukoz Toleransı

BKİ : Beden Kitle İndeksi

BKO : Bel Kalça Oranı

BM : Beyaz Madde

CCK : Cholecystokinin (Kolesistokinin)

CV : Coefficient of variation (Değişim katsayısı)

DD : Diyet Direnci

DİO : Diyetle İndüklenmiş Obez

DKB : Diastolik Kan Basıncı

DM : *Diabetes Mellitus*

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

EASD : European Association for the Study of Diabetes (Avrupa Diyabet Araştırmaları Birliği)

ECs : Endocannabinoid

EGIR : European Study Group of Insulin Resistance (İnsülin Direnci Avrupa Çalışma Grubu)

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

F10 : İçme Sularına %10 Fruktoz Eklenmesi

F60 : Yemlerine %60 Fruktoz Eklenmesi

FÜDAM : Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi

GGT : Gama Glutamil Transpeptidaz

GIP : Gastrik İnhibitör Peptid

GLP–1 : Glucagon Like Peptide–1 (Glukagon Benzeri Peptid-1)

GLUT : Glucose Transporter

GM : Gri Madde

HDL-K : High-Density Lipoprotein Cholesterol (Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol)

HE : Hematoksilen-Eozin

HRP : Horseradish Peroxidase

HSD : Yüksek Sukroz Diyeti

IDF : International Diabetes Federation (Uluslararası Diyabet Federasyonu)

İD : İnsülin Direnci

İHK : İmmünohistokimyasal

İP3 : Fosfotidilinositol-3

İRS : İnsülin Reseptör Substrat

K : Kontrol

KIU : Kallikrein Inhibitor Unit

LDL-K : Low-Density Lipoprotein Cholesterol (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol)

LİMA : Left İnternal Mammary Artery

MetS : Metabolik Sendrom

METSAR : Türkiye Metabolik Sendrom Sıklığı Araştırması

MSS : Merkezi Sinir Sistemi

NAFL : Non-Alcoholic Fatty Liver (Alkole Bağlı Olmayan Karaciğer Yağlanması)

NCEP : National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (Ulusal Kolesterol Eğitim Programı)

ND : Yüksek Nişasta Diyeti

NHANES III : National Health And Nutrition Examination Survey III (Ulusal Sağlık ve Beslenme Değerlendirme Araştırması)

PBS : Phosphate Buffer Saline (Fosfat Tampon Çözeltisi)

PCOS : Polycystic Over Syndrome (Polikistik Yumurtalık Sendromu)

PYY : Peptid YY

SA : Standart-α

Sal-α : Salusin-α

Sal-β : Salusin-β

SAS : Sleep Apnea Syndrome (Uyku Apnesi Sendromu)

SB : Standart-β

SD : Standart Deviation

SKB : Sistolik Kan Basıncı

T_2DM : Tip 2 Diyabet (*Diabetes Mellitus*)

TAG : Triaçilgliserol

TEKHARF : Türk Erişkinleri Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması

TG : Trigliserid

TK : Total Kolesterol

TMB-S : TMB Substrat

TNF-α : Tumor Necrosis Factor Alpha

TP : Total Protein

UCP2 : Uncoupling Protein 2

ÜA : Ürik Asit

VKİ : Vücut Kitle İndeksi

VLDL-K : Very Low Density Lipoprotein Cholesterol (Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol)

VSMC : Vascular Smooth Muscle Cell (Vasküler Düz Kas Hücreleri)

WAT : White Adipose Tissue (Beyaz Yağ Dokusu)

WHO : World Health Organization

1. GİRİŞ

1.1. Metabolik Sendrom

Metabolik sendrom (MetS) ülkemizde ve dünya genelinde gittikçe artan ciddi bir halk sağlığı sorunu olup, genel olarak kardiyovasküler hastalık, tip 2 diyabet (*Diabetes Mellitus*: T_2DM) ve obeziteyle birlikte karakterize edilmektedir [1]. Ülkemizde MetS'in her 8 erişkin bireyden 3'ünde görüldüğü ve kalp hastalarının %53'lük kısmında MetS oluşacağı öngörülmektedir [2]. MetS'in ülkelere göre dağılımı tezin ilerleyen kısımlarında detayları ile verilecektir.

Glukoz intoleransı, dislipidemi, abdominal obezite, alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması (*Non-Alcoholic Fatty Liver*: NAFL), insülin direnci (İD) ve hipertansiyonu kapsayan kardiyometabolik risk faktörlerinin bir bileşiminden oluşan MetS'in etiyolojisi tam olarak bilinmemesine karşın, genetik ve çevresel etkenlerin ilişkisiyle kendini gösterdiği düşünülmektedir [1]. Avrupa Diyabet Araştırmaları Birliği (*European Association for the Study of Diabetes*: EASD) 1965 yılında MetS'in hiperglisemi, obezite ve hipertansiyonun birlikteliğiyle meydana gelen bir sendrom olduğunu ileri sürmüştür [3]. MetS'in tanımı ilk kez, 1920'li yıllarda İsveçli bilim adamı Kylin tarafından hipertansiyon, gut ve hiperglisemi hastalığının bir araya gelmesi şeklinde yapılmış olup, 1940'lı yılların son döneminde ise diyabet, gut, obezite ve ateroskleroz hastalığı ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. 1947'de Vague vücuttaki yağ dokusunun dağılımına işaret ederken, obezite fenotipinin kardiyovasküler hastalıklar ve T_2DM'li hastalarda görülen anomalilerle bağlantısı olduğunu ileri sürmüştür. [1].

Bu tanımları takiben 1970'li yılların sonlarında ise ilk kez Alman araştırmacılardan Haller ve arkadaşları "metabolik sendrom" terimini kullanmıştır. Araştırıcılar bu dönemde MetS'in aterosklerozla bağlantısını araştırmışlardır [4]. Reaven 1988'de o döneme kadar MetS kriterlerinden ayrılmaz bir parça olarak gösterilen obeziteyi bu tanım içerisine koymayıp; glukoz toleransı, düşük HDL, hipertansiyon ve yüksek trigliserid'den meydana gelen risk etmenlerini "Sendrom X" olarak tanımlanmıştır [5]. Sendrom X'in kardiyovasküler hastalıklar için oldukça ciddi bir risk etmeni olduğu, kompensatuar hiperinsülinemi İD'nin MetS'in ortaya çıkmasındaki unsurların başında geldiği

bildirilmiştir [6]. Bu anormalliklere İD'nin sebep olduğu tahmin edildiği için de, 1991'de Ferrannini ve arkadaşları tarafından "insülin direnci sendromu" adı verilmiştir [4].

MetS tarihsel gelişim içerisinde; "dismetabolik sendrom", "plurimetabolik sendrom", "kardiyometabolik sendrom", "dislipidemik sendrom", "prediyabet", "dislipidemik hipertansiyon", "hipertrigliseridemik bel" ve "ölümcül dörtlü" terminolojileriyle anılsa da [7], aralarında NAFL, dislipidemi, hipertansiyon, alzheimer hastalığı, akciğer, prostat ve pankreas kanserleri, uyku apnesi sendromu (*Sleep Apnea Syndrome*: SAS) ve polikistik yumurtalık sendromu'nun (*Polycystic Over Syndrome*: PCOS) da içerisinde bulunduğu klinik tablolar, MetS kavramını kapsamaktadır [8,9].

1.1.1. Metabolik Sendromun Ülkelere Göre Yaygınlığı

MetS'in görülme sıklığı belirlenen tanımlama şekli ve populasyon farklarına bağlı olarak %3-37 arasında farklılık göstermektedir [10]. MetS prevalansı erişkin bireylerde %23.7 iken çocukluk dönemlerinde bu oranda %3-4'lük bir azalma görüldüğü bildirilmiştir [11].

Fransa'da Balkau ve arkadaşları 2003'de yaptığı araştırmada yaşa bağlı MetS prevalansının Amerikan toplumuna kıyasla yaklaşık 2.5 kat daha fazla düzeyde olduğunu belirlemişlerdir [12]. Finlandiya'da 24-39 yaşları arası kişileri içeren bir çalışmada MetS yaygınlığı, İnsülin Direnci Avrupa Çalışma Grubu (*European Study Group of Insulin Resistance*: EGIR) kriterlerine göre %9.8 iken, Uluslararası Diyabet Federasyonu (*International Diabetes Federation*: IDF) kriterlerine göre %14.3 olarak belirlenmiştir [13]. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1988 – 1994 yılları arasında 20 yaş üzeri yetişkin bireyleri kapsayan Ulusal Sağlık ve Beslenme Değerlendirme Araştırması (*National Health And Nutrition Examination Survey III*: NHANES III) çalışmasında MetS prevalansı; Ulusal Kolesterol Eğitim Programı-Erişkin Tedavi Paneli-III (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel*: NCEP / ATP III) kriterlerine göre %23.9 iken, Dünya Sağlı Örgütü (DSÖ) (*World Health Organization*: WHO) kriterlerine göre %25.1 olarak belirtilmiştir [14]. MetS prevalansı Meksika gibi az gelişmiş ülkelerde %26.6 [15] iken, onların ABD'de yaşayan akrabalarında %31.9 [16], İngiltere'de yaşayan akrabalarında ise %25 olarak bildirilmiştir [17].

Onat ve arkadaşları [18] tarafından NCEP / ATP-III kriterleri kullanılarak yapılan Türk Erişkinleri Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması (TEKHARF) çalışmasına göre MetS prevalansı toplumumuzda, 30 yaş ve üstü erkeklerde %28 iken kadınlarda bu oran %45 olarak belirlenmiştir. Bu durum esas alınarak 30 yaş ve üzerindeki tüm yetişkinlerin %37'sinde (9.1 milyon) MetS olduğu düşünülmektedir. MetS oranı 1990 yılında %24.4 iken, 2000 yılında bu oranın %36.2'ye arttığı görülmüştür [19].

2004 yılında 47 ilde, 4264 katılımcı ile yapılan Türkiye Metabolik Sendrom Sıklığı Araştırması (METSAR) sonuçlarına göre, Türkiye'de 20 yaş ve üzerindeki erişkinlerde MetS sıklığı %35 olarak belirlenmiştir. Bu araştırmada MetS yaygınlığı, kadınlarda %41.1 iken, erkeklerde %28.8 olarak tespit edilmiştir [20]. Hatun ve arkadaşları WHO kriterlerini baz aldıkları çalışmalarında 2-18 yaşları arasında 131 obez çocuk ve adolesan bireyde MetS prevalansının %20 oranında olduğunu rapor etmişlerdir [21]. Ağırbaşlı ve arkadaşları ise NCEP / ATP III kriterlerine göre 10-17 yaş aralığındaki 1385 sağlıklı Türk çocuk ve adölesan bireyde MetS prevalansının %2.2 oranında bulunduğunu bildirmişlerdir [22].

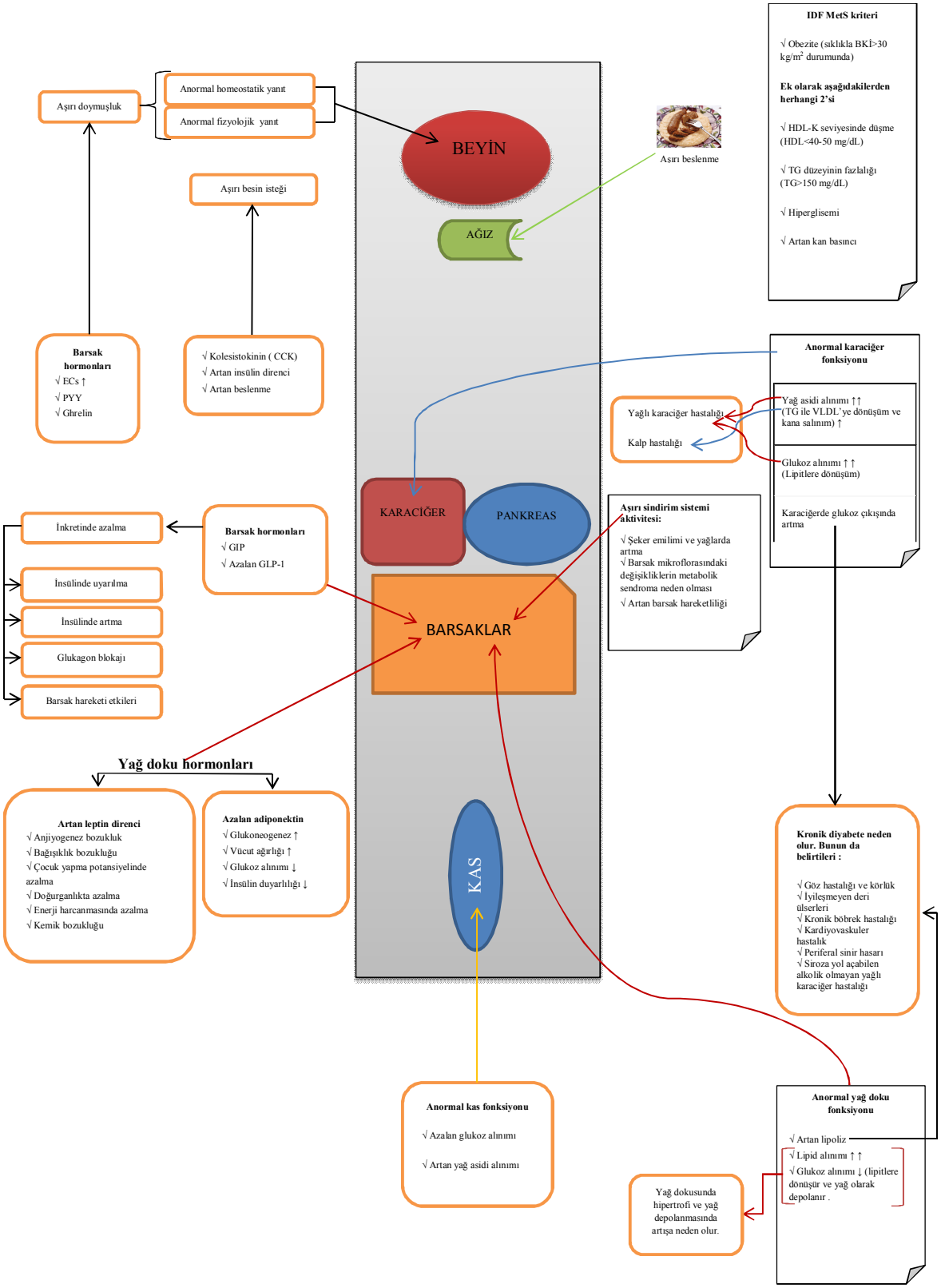
1.1.2. Metabolik Sendromun Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkileri

Organizmaların tüm endokrinal sistemlerini etkileyen MetS'in gelişimini en hızlı etkileyen faktör etiyolojisinde rolü olan obezitedir. Aşırı beslenmeye bağlı olarak beyinde meydana gelen fonksiyon bozukluğu, anormal fizyolojik ve homeostatik yanıt ile birlikte yağ dokusu miktarını arttırmaktadır. MetS'e bağlı olarak karaciğer ve beyin gibi birçok organda görülen fonksiyon bozukluklarının etkisiyle oluşan anormal değerler neticesinde vücudun homeostasisinde bozulma meydana geleceği bildirilmiştir.

Karaciğerde meydana gelen fonksiyon yetersizliklerine bağlı olarak alınan aşırı glukoz, yağ asitleri ve lipitlere dönüşmekte ve buna bağlı olarak da NAFL ortaya çıkmaktadır. Karaciğerde yağ asitlerinin trigliserid (TG) ve çok düşük yoğunluklu lipoproteine (*Very Low Density Lipoprotein Cholesterol*: VLDL-K) dönüşümlerinin artışı kalp hastalığı ve kronik diyabet oluşumuna yol açmaktadır. Kronik diyabetin belirtileri arasında; göz hastalıkları, iyileşmeyen deri ülserleri, periferal sinir zararları, kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek hastalığı ve siroza yol açabilen NAFL bulunur.

Viseral yağ dokusunun artışı ile lipit miktarı artmaktadır. MetS'e bağlı olarak artan İD, dolaşımdaki glukoz miktarının artmasına yol açmaktadır. Sirkülasyondaki ihtiyaç fazlası glukozlar yağlara dönüşerek yağ depolarında artışa neden olmaktadır. Kaslardaki fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak yağ asidi alınımında artış, glukozun alınmasında ise azalış meydana gelmektedir. Aşırı beslenmeye bağlı olarak; barsak hareketliliği, şeker emilimi ve yağ miktarlarında artış görüldüğü ve aynı zamanda barsak mikroflorasındaki değişikliklerin metabolik hastalıklara neden olduğu rapor edilmiştir. Yağ dokusu hormonlarından leptin direncinin artmasıyla birlikte; çocuk yapma potansiyelinde ve doğurganlıkta azalma olmakta, aynı zamanda anjiyogenez, bağışıklık sisteminde hasarlar ve kemik bozuklukları görülmektedir.

Barsaktan salgılanan hormonlardan glukagon benzeri peptid-1 (*Glucagon Like Peptide–1*: GLP–1)'in azalması, gastrik inhibitör peptid (GIP)'i de etkileyerek, inkretin düzeyinde düşmeye neden olmaktadır. Bu biyokimyasal olayın akıbetinde insülinde uyarılma ve glukagonda blokaj ortaya çıkmaktadır. Beslenme ile İD'nin artması ve barsak hormonlarından Kolesistokinin (*Cholecystokinin*: CCK)'in de etkisiyle organizmada aşırı besin alma isteği ortaya çıkmaktadır. Barsak hormonlarından endokannabinoid'lerin (*Endocannabinoids*: ECs) artması, peptid YY (PYY) ve ghrelin yolaklarının kullanılmasıyla aşırı beslenme isteği devreye girmektedir. Yukarıda anlatılan tüm fizyolojik ve biyokimyasal olaylar Şekil 1.1'de özetlenmiştir [23].



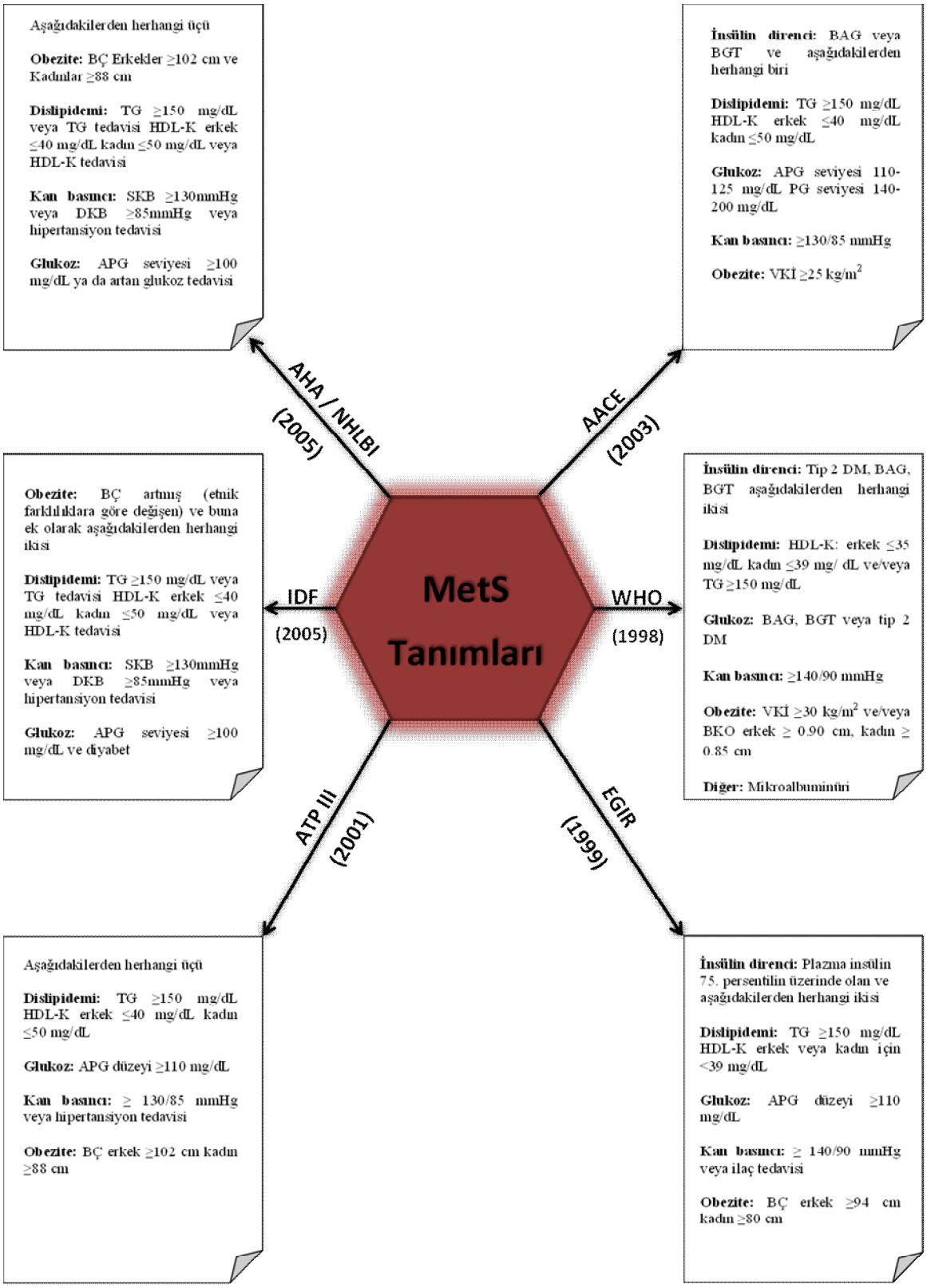
Şekil 1.1. Metabolik sendromun fizyolojik ve biyokimyasal etkileri [23]

1.1.3. Metabolik Sendrom Tanımı Yapan Çalışma Grupları

Bu kompleks hastalığın tanımı için birçok çalışma grubu çeşitli tanımlamalar yapmış olup, tezin bu kısmında bu çalışma gruplarının ana kriterlerine genel hatlarıyla bakılacaktır. Tez çalışması boyunca ATP III kriterleri kullanılacağından, tezin bu kısmında ATP III kriterleri detaylarıyla verilecektir. Bu çalışma gruplarının neler olduğuna tarihsel süreç içerisinde bakacak olursak; ilk resmi tanımlama 1998'de WHO tarafından yapılmış [24], daha sonra 1999'da EGIR [25], 2001'de NCEP / ATP III [26], 2003'de Amerikan Klinik Endokrinologları Derneği (*American Association of Clinical Endocrinologists*: AACE) [27], 2005'de Amerikan Kalp Derneği / Ulusal Kalp, Akciğer ve Kan Enstitüsü; (*American Heart Association / National Heart, Lung, and Blood Institute*: AHA / NHLBI) [28] ve 2005'de ise IDF [29] tanı kriterlerini ortaya koymuştur. Çalışma gruplarına göre MetS kriterlerinin şematik özeti Şekil 1.2'de detayları ile verilmiştir [30].

1.1.4. ATP III Kriterleri

Bu altı çalışma grubundan kriterleri en yaygın olarak kullanılanı NCEP / ATP III tarafından 2001'de belirlenen kriterler olup, kardiyovasküler hastalık risk faktörlerini kapsamaktadır [26]. ATP III kriterlerinde majör faktörün abdominal obezite olduğu görülmektedir. Bu kriterlere göre MetS tanısı konabilmesi için; bel çevresinin erkeklerde ≥ 102 cm, kadınlarda ise ≥88 cm olması; veya insanlarda VKİ ≥ 30 kg/m^2; ratlarda VKİ ≥ 1.00 g/cm^2 ayrıca dislipidemi; TG ≥ 150 mg/dL; yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (*High-Density Lipoprotein Cholesterol*: HDL-K) erkeklerde ≤ 40 mg/ dL, kadınlarda ≤ 50 mg/ dL; açlık plazma glukoz (APG) düzeyinin ≥ 110 mg/dL olması ve kan basıncının hipertansiyon tedavisi gerektirecek düzeyde olması veya ≥ 130/85 mmHg olması şeklinde özetlenebilir. Abdominal obezite, dislipidemi, APG ve kan basıncı olarak belirtilen bu dört faktörün yukarıda belirtilen referans aralıkları esas alındığında herhangi üçünün bir arada olması ATP III kriterleri için yeterli olmaktadır [26].



Şekil 1.2. Çalışma gruplarına göre metabolik sendrom tanı kriterleri [30].

1.1.5. Metabolik Sendrom Oluşturma Modelleri

MetS'in fizyolojisini ve etiyopatolojisini anlamak için sıçan ve fare gibi farklı hayvan modelleri kullanılmaktadır [31]. Bu modellere tek tek göz attıktan sonra, çalışmada kullanacağımız içme sularına %10'luk fruktoz eklenmesi modeli ve etki mekanizması ise detaylı bir şekilde incelenecektir.

1.1.5.1. Fruktoz (%60-70 kcal)

Bu yolla MetS kriterlerinden İD ile hipertrigliseridemi gelişir ve bu kritere ulaşmak için en uygun hayvan golden hamster veya syrian hamster olarak bilinen *Mesocricetus auratus* türü kemirgendir. 2 haftalık diyet sonrasında hem İD hem de hipertrigliseridemi görüldüğü bildirilmiştir [32].

1.1.5.2. Yüksek Doymuş Yağ ve Kolesterol (%0.05-1)

Mesocricetus auratus türü hamster kullanılarak yapılan deneyde diyet başlangıcında vücut ağırlıkları ve besin tüketimi bakımından aralarında farklılık bulunmayan kontrol ve diyet gruplarında, 2 haftalık beslenme sonrasında plazma kolesterol seviyelerinin gruplar arasında yaklaşık benzer oranlarda olduğu ölçülmüştür. Diyetin 6. haftasında ise karaciğer total kolesterol (TK) konsantrasyonları, karaciğer serbest kolesterol konsantrasyonları ve aortik TK konsantrasyonlarında gruplar arasında önemli farklılıklar görülmemiş, ancak ateroskleroziz ile hiperkolesterolemi'nin görüldüğü rapor edilmiştir [33].

1.1.5.3. Yüksek Doymuş Yağ ve Yaklaşık % 0.3'lük Kolesterol

Cavia porcellus türü 250-300 g ağırlığındaki dişi kobayların (Hartley Guinea Pig) kontrol ile karşılaştırıldığında diyet grubunda; vücut ağırlığı, total plazma HDL-K ve

düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (*Low-Density Lipoprotein Cholesterol*: LDL-K) bakımından farklılıklar görülmemiştir. Daha önceden yapılan çalışmalarda, üzüm suyu tüketimi durumunda plazma TG sevilerinde bir artış olacağı bildirilmesine rağmen, bu çalışmada üzüm polifenollerinin alınımında TG ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (*Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol*: VLDL-K) seviyelerinde %39-50 azalma oluşturarak olumlu yönde bir etki oluşturmuştur. Aynı zamanda üzüm alınımı lipoprotein metabolizması ve kompozisyonunda rol oynayabilen *Acyl-CoA* (*Cholesterol Acyl Transferase* (ACAT) aktivitesini düşürmüştür. Bununla birlikte 12 haftalık diyet (0.33 g kolesterol / 100 g besin) sonrasında aterosklerozis ve hiperkolesterolemi görülmüştür [34,35].

1.1.5.4. Yağ (%45-60 kcal) ve Diğer Yağ Kaynakları

Bu diyet tipinde MetS kriterlerinden hiperglisemi ve obezite gelişir. Bu kritere ulaşmak için en önemli hayvan modeli C57BL/6 fareleridir. Vücut ağırlığı bakımından 1 haftalık diyet programında yüksek ve düşük yağ diyetleriyle beslenen gruplar arasında belirgin farklılıklar vardır. Hiperglisemi'nin ortaya çıkması ise yaklaşık 4 haftalık süre içerisinde gerçekleşmektedir [36].

1.1.5.5. Doygunluğu Yüksek Yağ, Kolesterol (%1) ve Kolik Asit (% 0.5)

Bu çalışmada yaklaşık 19 g ağırlığında C57BL/6J fareleri seçilmiş olup, 4 haftalık diyet sonrasında diyet grubunda kontrol grubuna oranla total plazma kolesterol seviyeleri daha yüksek düzeyde ölçülmüştür. 18 haftanın sonunda gruplar arasında istatistiksel olarak vücut ağırlığı bakımından önemli farklılıklar görülmemiştir. 14-18 haftalık diyet sonrasında hafif düzeyde aterosklerozis ve hiperkolesterolemi görülmüştür [37].

1.1.5.6. Yağ (%10-58 Kcal), Diğer Yağ ve Karbohidrat Kaynakları

Obeziteye karşı direnç oluşturan A/J fareleri, C57BL/6 farelerine benzer özellikte kalori almalarına karşın obez olmazlar. A/J farelerinin beyaz yağ dokusunda (*White Adipose Tissue*: WAT) bulunan mRNA'nın, *Uncoupling Protein 2* (UCP2)'nin ekspresyonunu uyardığı görülmüştür. AKR/J farelerinde ise uygulanan yüksek yağ diyeti sonucunda metabolik etkinin artmasıyla birlikte yağ depolaması artmakta ve enerji alınımı bakımından farklılıklar görülmektedir. Bu farklılığı şöyle açıklayabiliriz; yüksek yağ diyeti ile beslenen AKR/J fareleri SWR/J sıçanlarından daha fazla metabolik enerji oluşturmalarına karşın, C57BL/6 fareleriyle karşılaştırıldıklarında yüksek yağ diyetlerinde obez oldukları bildirilmiştir [38].

1.1.5.7. Kolesterol (%0.1-1.25)

Kontrol grubuyla kıyaslandığında, yüksek yağ ve %0.5 kolesterol (%1.25 kolesterol, %7.5 kakao yağı, %7.5 kasein ve % 0.5 kolik asit) diyeti alan erkek $LDLR^{-/-}$ farelerinde diyetin 12. haftasının sonunda vücut ağırlığında bir artış, aterosklerozis ve hiperkolesterolemi saptanmasına karşın karaciğer fonksiyon testleri sonuçlarına göre; karaciğer parankima ve safra sisteminde önemli bir sorun oluşmadığı bildirilmiştir [39].

1.1.5.8. Yağa (% 48 kcal) Yem Eklenmesi

ZDF sıçanlarının kullanıldığı bu modelde; %48 kcal'a kadar çeşitli yağ diyetleri verilerek, gruplar arasında besin ve su kısıtlanması yapılmadan, beslenmeleri sonunda sabahları kanları alınmıştır. %12.3, 16.7 ve 25.9 kcal'lik yağ diyetleri verilen erkek ZDF sıçanlarında; %12.3 kcal'lik yağ diyeti sonrasında hiperglisemi oluştuğu, dişi ZDF sıçanlarında ise; %12.3 ve 16.7 kcal'lik yağ diyetlerinde hiperglisemi gelişmediği ancak %48 kcal'lik yağ diyetinde hipergliseminin hızlı bir şekilde arttığı gözlendi. Bu veriler ışığında; erkek ZDF sıçanlarının düşük orandaki yağ diyetine duyarlı olduğu, dişi ZDF sıçanlarında ise çok yüksek yağ içerikli (%48 kcal) diyetlerde diyabet oluştuğu bildirilmiştir [40].

1.1.5.9. Sodyum Klorür (% 8)

Hipertansiyonun patogenezine katkıda bulunduğu bilinen yüksek tuz diyeti, aynı zamanda İD ile de ilişkilidir. Dahl-S sıçanlarının yüksek tuz diyeti ile beslenen bireyleri, normal diyetle beslenenlerden daha düşük vücut ağırlığına sahip olmakla birlikte, gruplar arasında önemli bir değişiklik oluşmamıştır. Yine yüksek tuz diyeti ile beslenen Dahl-S sıçanlar normal diyetle beslenenlerle kıyaslandığında sistolik ve diastolik kan basıncında önemli bir artış gözlemlenmiştir. Tuz yüklenmesi durumunda ise; kan basıncında, kan şekerinde ya da plazma insülin seviyelerinde etkisi bulunamamıştır. Hiperinsülinemik-Öglisemik çalışmaların değerlendirilmesi için Dahl-S sıçanların saflaştırılmış diyetine 2 – 4 hafta süresince %8'lik NaCI eklenmesiyle İD ve hipertansiyon oluştuğu bildirilmiştir [41,42].

1.1.5.10. Yağ (%32 kcal)

Bu modelde *Sprague-Dawley* türü erkek sıçanlara %32 kcal'lik yağ içeren diyet 10 hafta süresince verilmiştir. Deneyde obeziteye eğilimli sıçanların sistolik kan basıncı, arterial hipertrofi ve plazma renin aktivitesinde iki kat artış meydana gelmiştir. Ayrıca lipit peroksidasyonu bakımından obeziteye dirençli sıçanlarla karşılaştırılan obeziteye eğilimli sıçanlarda; LDL-K düzeylerinin 2 kat, aortik duvarının ise 1.5 kat artış gösterdiği görülmüştür. Araştırmanın sonuçları, hipertansiyon ve renin-anjiyotensin sistem aktivasyonunun obeziteyle ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca obezitenin lipit peroksidasyonu ve böbreklere zararlı etkenlerinin bulunduğunu göstermiştir. Obezite, hipertansiyon için bir risk faktörü olmasına rağmen, bu iki durum arasındaki ilişki iyi anlaşılamamıştır. Diyetle uyarılmış bu obezite modeli hipertansif obez insanlarda da benzer bir özellik göstermekte olup, bu duruma renal ve vasküler değişiklikler eşlik etmektedir [43].

1.1.5.11. Yağ (%30-60 kcal) ve Diğer Yağ Kaynakları

Sprague-Dawley türüne ait erkek sıçanlar yüksek, orta ve düşük kalorili yağ içeren kaynakların saf diyete eklenmesiyle beslendiği bu modelde; yüksek yağ diyetiyle beslenen sıçanlarda ilk 6 hafta içerisinde vücut ağırlıklarında ciddi düzeyde artış gözlenmiştir. 2-10 haftalık diyet programında, diyetle indüklenmiş obez (DİO) ve diyet direnci (DD) olan sıçanlar arasında belirgin farklılıklar görülmüş, ayrıca kullanılan yağ çeşidinin kilo alınımında etkili olabildiği bildirilmiştir [44].

1.1.5.12. Sukroz (%60-70 kcal)

Wistar albino türü erkek sıçanlara 8 hafta süresince %60-70 kcal'lık sukroz diyeti; yüksek nişasta diyeti (ND) ya da yüksek sukroz diyeti (HSD) verilerek; İD, TG konsantrasyonu ve karaciğer yağ asidi kompozisyonu değişimleri incelenmiştir. ND ve HSD diyetleri karşılaştırıldıklarında; vücut ağırlığı, vücut yağ oranı ve karaciğer yağ asidi kompozisyonu bakımından benzer sonuçlar ortaya çıkmasına rağmen, ND diyetinde ikinci, beşinci ve sekizinci haftalarda kas glikojen sentezinde azalma meydana gelmiştir. İD'nin gelişimi kaslardan önce karaciğerde görülmüştür. Bu farklılığın karaciğer ve kastaki trigliserid konsantrasyonundaki değişikliklerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda ND diyeti karaciğer ve plazma trigliseridlerini arttırmasına rağmen, total karaciğer fosfolipidlerinin yağ asit kompozisyonunda önemli değişikliklere neden olmadığı bildirilmiştir [45].

Sprague-Dawley türü erkek sıçanlarda 2 haftalık diyet sonrasında hem İD hem de hipertrigliseridemi görülmüştür. Basit şeker alınımları farklı olduğu için, sukrozla uyarılan sütten kesilmiş sıçanlarda yaşlı sıçanlardan farklı olarak hipertrigliseridemi görülmez. Yüksek yağ diyetinde ise sütten kesilmiş, genç ve erişkin sıçanlarda İD görülmektedir [46].

1.1.5.13. Fruktoz (%60)

Sprague-Dawley ve *Wistar albino* türü sıçanların yemlerine %60 oranında fruktoz (F60) eklenmesiyle 6-8 haftanın sonunda yüksek kalori alınımına bağlı olarak; preglomerular damarların arteriolopatisi, kortikal vazokonstriksiyon, glomerular hipertansiyon ve böbrek hipertrofisinde artma olduğu bildirilmiştir [47].

1.1.5.14. İçme Sularına Fruktoz (%10)

Sprague-Dawley ve *Wistar albino* türü sıçanların içme sularına %10 oranında fruktoz (F10) eklendiğinde birinci haftanın sonunda fruktozun etkisiyle; hipertansiyon oluşmakta [48], sekizinci haftanın sonunda; sistolik kan basıncı, plazma ürik asit (ÜA) ve TG düzeyleri ölçüldüğünde ise; fazla bir artışın oluşmadığı görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; vücut ağırlıkları, plazma glukozu ve idrarda albumin atılması anlamında önemli farklılıklar görülmemiştir [47]. Klinik verilere göre fruktoz tüketiminin artmasıyla kilo artışı arasında bir paralellik görülmektedir [48]. İçme sularına F10 katılmasıyla artan hipertansiyon, hiperürisemi ve hipertrigliseridemi'ye bağlı olarak MetS'in uyarılması gerçekleşmiştir [47]. Bu çalışmada da fruktozla indüklenerek MetS oluşturulacaktır.

1.1.6. Diyete Fruktoz Eklenmesinin Biyokimyasal ve Fizyolojik Etkileri

Tablo 1.1. Sıçanların içme sularına F10 veya yemlerine F60 katılmasının biyokimyasal ve fizyolojik sonuçları [47,48]

Parametre	F10	F60
MetS oluşturma süresi	Uzun	Kısa
Harcanan besin miktarı	Az	Çok
Sistolik kan basıncı, plazma ürik asit ve trigliserit seviyesi	Az artış	Çok artış
Glomerular plazma akışı	Az azalma	Belirgin azalma
Vücut ağırlığı, plazma glukozu ve idrarda albümin atılması	Fark yok	
Ortaya çıkan etkiler	Hipertansiyon, hiperürisemi hipertrigliseridemi ve böbrek hipertrofisinde hafif artma	Preglomerular damarların arteriolopatisi, kortikal vazokonstriksiyon, glomerular hipertansiyon ve böbrek hipertrofisinde belirgin artma

1.1.7. Metabolik Sendrom Modellerinin Karşılaştırılması

Tablo 1.2 31 nolu kaynaktan değiştirilerek çizilmiştir [31].

Tablo 1.2. Deneysel metabolik sendrom modellerinin karşılaştırılması

Hayvan modeli	Diyet içeriği	Etkisi	Yorumlar
Golden Syrian Hamster	Fruktoz (%60-70 kcal)	İnsülin direnci ve hipertrigliseridemi	Golden Syrian Hamsterlar'da 2 haftalık diyet sonrasında hem insülin direnci hem de hipertrigliseridemi görülmektedir.
Golden Syrian Hamster	Yüksek doymuş yağ ve kolesterol (%0.05-1)	Aterosklerozis ve hiperkolesterolemi	6 haftalık diyet sonrasında aterosklerozis ve hiperkolesterolemi oluşmaktadır
Hartley Guinea Pigs	Yüksek doymuş yağ ve yaklaşık % 0.3'lük kolesterol ile	Aterosklerozis ve hiperkolesterolemi	12 haftalık diyet sonrasında aterosklerozis ve hiperkolesterolemi görülmektedir
C57BL/6 fare	Yağ (%45-60 kcal) ve diğer yağ kaynakları	Hiperglisemi ve obezite	Vücut ağırlığı bakımından 1 haftalık diyet programında yüksek ve düşük yağ diyetleriyle beslenen gruplar arasında belirgin farklılıklar vardır. Hiperglisemi'nin ortaya çıkması ise yaklaşık 4 haftalık sürede oluşmaktadır.
C57BL/6 fare	Doygunluğu yüksek yağ, kolesterol (%1), kolik asit (%0.5)	Aterosklerozis ve hiperkolesterolemi	14-18 haftalık diyet sonrasında hafif düzeyde aterosklerozis ve hiperkolesterolemi oluşmaktadır.
AKR ve A/J fareleri	Yağ (%10-58 kcal), diğer yağ ve karbohidrat kaynakları ile	Obezite direnci, insülin direnci ve obezite	A/J fareleri C57BL/6 farelerine benzer kalori almalarına rağmen obez olmazlar. AKR fareleri ise C57BL/6 fareleriyle mukayese edildiklerinde daha çok insülin direnci gelişir daha fazla glukoz toleransı oluşur ve yüksek yağ diyetlerinde obez olurlar.
$LDLR^{-/-}$ fare	Kolesterol (%0.1-1.25)	Aterosklerozis ve hiperkolesterolemi	12 haftalık diyet sonunda aterosklerozis ve hiperkolesterolemi görülmektedir.
ZDF rat	Yağa (%48 kcal) yem eklenmesi	Diyabet ve obezite	Erkek ZDF ratların standart chow beslenmesinde diyabet oluşmakta ancak daha yüksek yağ diyetlerinde ise hastalık daha ciddi bir durum alır. Dişi ZDF ratlarında ise diyabetin oluşabilmesi için minimum %48 kcal'lik yağ diyeti kaçınılmazdır.
Dahl SS rat	Sodyum klorür (%8)	Hipertansiyon	2 ile 4 haftalık diyet sonrasında hipertansiyonda artış görülmektedir.
Sprague dawley sıçan	Yağ (%32 kcal)	Hipertansiyon ve obezite	10 hafta sonunda yüksek yağ diyetinin etkisiyle hipertansiyon ve obezitede artma görülmektedir
Wistar albino ve Sprague dawley sıçan	Yağ (%30-60 kcal) ve diğer yağ kaynakları	Obezite	2-10 haftalık diyetde, diyetle uyarılmış obez (DIO) ve diyet direnci (DR) olan ratlar arasında belirgin farklılıklar olup, yağ çeşidi kilo alınımında etkili olabilmektedir.
Wistar albino ve Sprague dawley sıçan	Sukroz (%60-70 kcal)	İnsülin direnci ve hipertrigliseridemi	2 haftalık diyet sonrasında hem insülin direnci hem de hipertrigliseridemi meydana gelmektedir.
Wistar albino ve Sprague dawley sıçan	Fruktoz (%60)	Hipertansiyon	6-8 haftalık diyet sonrasında hipertansiyonda bir artma görülmektedir.
Wistar albino ve Sprague dawley sıçan	İçme sularına fruktoz (%10)	Hipertansiyon, hiperürisemi ve hipertrigliseridemi	12 haftalık diyet sonunda Hipertansiyon, hiperürisemi ve hipertrigliseridemi oluşmaktadır.

1.1.8. Fruktozun Metabolik Sendrom Oluşturma Mekanizması

Fruktoz metabolizmasından farklı olarak; glukoz metabolizmasında ATP harcanmasında negatif regülatuar mekanizma görülmez [49]. Fruktozun gerek insanlarda [50] ve gerekse kemirgenlerde [51] ÜA yoğunluğunda artışa neden olduğu görülmüştür [49]. ÜA düzeyinin artmasıyla birlikte İR, hiperinsülinemi, hipertrigliseridemi ve hipertansiyon ortaya çıkmaktadır [52]. Adiposit, barsak, epitelyum ve karaciğer hücreleri başta olmak üzere, hücrelere giren fruktoz sırasıyla; fruktoz 1-fosfata [53], aldolaz

enzimleri kullanılarak triozlara ve buradan yağ asidi sentezine yönlendirilirler [54]. Fruktoz, glukozdan daha fazla triaçilgliserol (TAG) oluşmasına neden olmaktadır. TAG düzeyinin artmasıyla MetS oluşacağı ve kardiyovasküler hastalık riskinin artacağı rapor edilmiştir [55]. Fruktoz; böbrek ve ince barsaklarda sodyum tutulmasına neden olarak hipertansiyon oluşturmakta ve böylece MetS meydana gelmektedir [56].

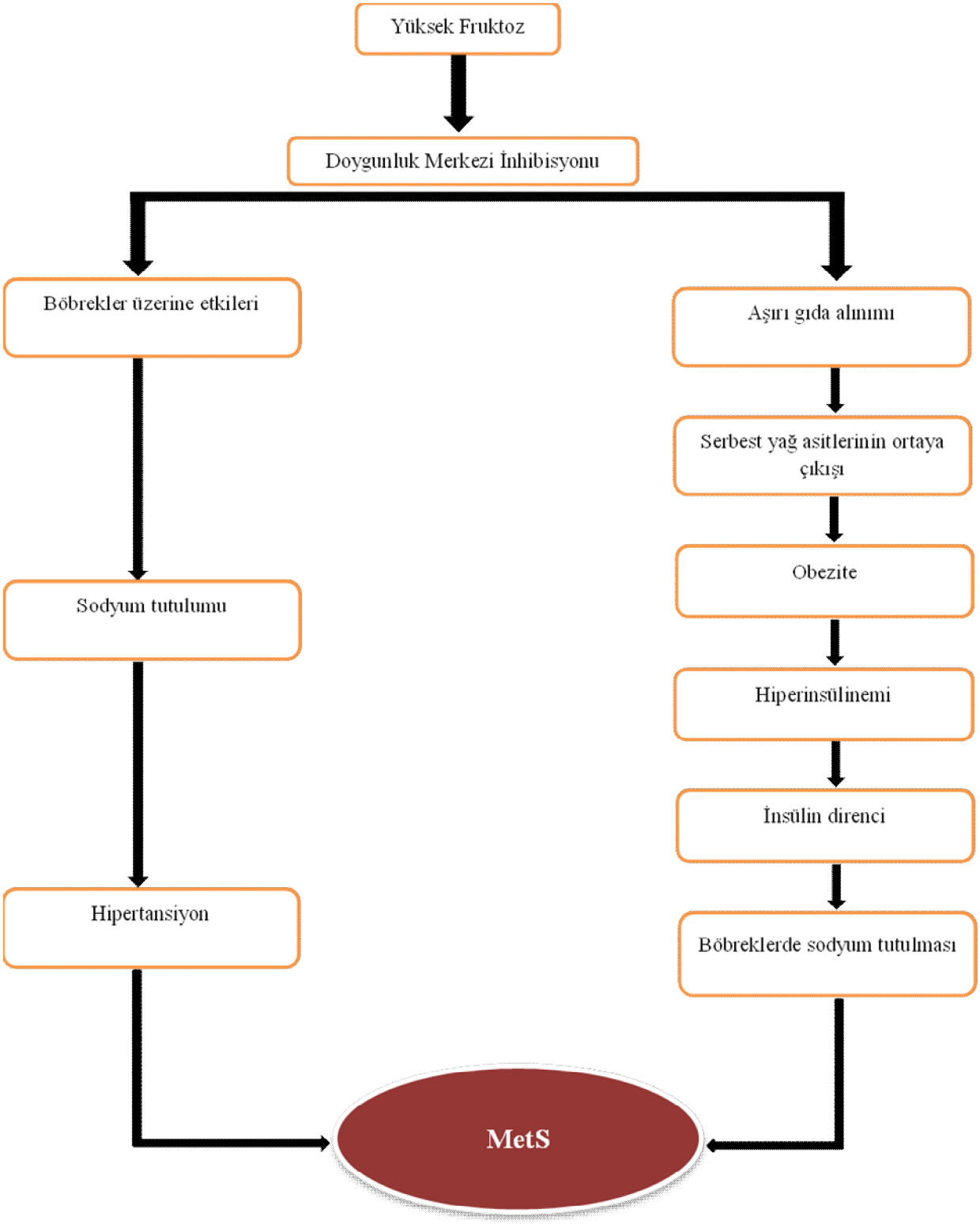
Beslenme yoluyla alınan fruktozun hücre içerisine taşınması glukoz taşıyıcısı olarak bilinen *Glucose Transporter-5* (GLUT–5) reseptörü ile sağlanmaktadır. Fruktozun hücre içine alınmasında rol oynayan GLUT-5 karaciğer dokusunda bulunmasına karşın, beyin ve pankreasın beta (β) hücrelerinde bulunmadığından; fruktoz bu hücrelerin içerisine alınamamaktadır. Böylece fruktoz içeriği fazla olan besinlerin alınımını takiben beyinde doygunluk merkezi uyarılamayacak ve buna bağlı olarak da aşırı gıda alınımıyla birlikte MetS bulgularının ortaya çıkacağı rapor edilmiştir [57]. Bu mekanizmalar şematik olarak özetlenmiştir (Şekil 1.3).

1.2. Beyin ve Karaciğer Dokuları

Bu tez çalışmasında MetS oluşturulduktan sonra sıçanların beyin ve karaciğer dokularında salusin-α (Sal-α) ve salusin-β (Sal-β) ekspresyonlarının nasıl değiştiği inceleneceğinden, tezin bu kısmında beyin ve karaciğer dokularının histolojik yapı ve fonksiyonları kısaca özetlenecektir.

1.2.1. Beyin

Beyin; beyincik ve omurilikle birlikte merkezi sinir sistemini (MSS) oluşturmaktadır [58]. Kafatası içerisinde yer alan ve MSS'nin en büyük bölümü olarak kabul edilen beyin, *cerebrum* (beyin yarımküreleri: *telencephalon*), *diencephalon* (ara beyin), *truncus cerebri* (beyin sapı) ve *cerebellum* (beyincik) olmak üzere dört kısımda incelenmektedir. Sinir dokudan gelişen beyin, embriyolojik bakımdan önden arkaya doğru *prosencephalon* (ön beyin), *mesencephalon* (orta beyin) ve *rhombencephalon* (arka beyin) keseciklerinin gelişmesiyle oluşur [59].



Şekil 1.3. Fruktozla MetS oluşma sürecinin başlıca ana mekanizması

Beyin kesiti alındığında beyincik ve omurilikte olduğu gibi gri (gri madde: GM) ve ak (beyaz madde: BM) bölgeleri görülmektedir. İki bölgenin farklı olmasını sağlayan faktör; miyelinin MSS'deki dağılım oranındaki farklılıklardır. GM içerisinde; aksonlar, dendritler, nöron hücre gövdeleri ve glia hücresinin başlangıç bölümündeki miyelinsiz kısımları bulunur. BM'nin ana yapısını ise; miyelin oluşturan oligodendrositler ve miyelinli aksonlar oluşturmaktadır. BM daha merkezi bölümde bulunurken GM beynin ve beyinciğin yüzeyinde belirgin görünümde olup, beyin ve beyinciğin korteks kısmını oluşturmaktadır.

Beyinin korteksinde yer alan GM 6 tabakadan oluşmuş olup, bu tabakaların kapsadığı hücreler farklı şekil ve boyutlardadır [58]. 15 milyardan fazla nöron içeren insan beyninin total ağırlığının %40'ını 1.5-4.5 mm kalınlığındaki korteks bölümü oluşturmaktadır. Beyin korteksinin en dış yüzeyi, yapısındaki katlanmalar sonucu ortalama 2000 cm^2'lik bir alan oluşturmaktadır. Korteksin belirli bölümlerinde yer alan, dev piramidal nöronlar olarak bilinen, Betz hücrelerinin çapı 100 μm'den daha büyüktür. Kortikal nöronların 5 tipi olup bunlardan en çok bulunanları, yıldız hücreleri ve piramidal hücrelerdir. Hücrelerin taban bölgesinden çıkan bir akson, korteksin derin tabakalarına kadar uzanmakta ve buradan medullar BM'ye girmektedir [60].

1.2.2. Karaciğer

En ağır ve en geniş hacme sahip iç organ olan karaciğerin erişkin bir insandaki ağırlığı yaklaşık 1.5 kg olup, oldukça iyi gelişmiş bir damar ağına sahiptir. Kaburga kemikleri tarafından korunan karaciğer, karın boşluğunun sağ üst bölümünde diyaframın alt kısmına yerleşmiştir. Karaciğerin yaklaşık eşit büyüklükteki sağ ve sol lobları birbirinden teres (yuvarlak) ve falsiform ligamentlerle ayrılmıştır. Karaciğer dokusunun ortalama %80'i hepatositlerden oluşan parankima, %20'si ise glisson kapsülünü de oluşturan stroma bölümüdür [60]. Karaciğer loblarının etrafı glisson kapsülü olarak bilinen elastik ve kollojen lif içeren kapsül tarafından kuşatılmıştır [61].

Glisson kapsülünün görevleri arasında; karaciğerin şeklinin korunması, organa destek olması ve sahip olduğu az sayıdaki küçük kan damarları sayesinde karaciğer

parankimasının iç kısmına uzantılar göndererek destek stromasına yardımcı olduğu düşünülmektedir [60].

Karaciğere kanın girişi *portal ven* ve *hepatik arter* olmak üzere iki kan damarı tarafından sağlanmaktadır. Karaciğere gelen kanın %70-80'i *portal ven* tarafından dalak, mide ve ince barsaklardan taşınırken, %20-30'u ise *hepatik arter'*lerle gerçekleşir. İnce barsaklardan emilen maddelerin büyük bir kısmı *portal ven* yoluyla karaciğere ulaştırılırken, kompleks lipitler lenf damarları aracılığıyla karaciğere taşınmaktadır [58].

Karaciğerin temel yapı elemanları hepatositlerdir. Bu epitelyal hücreler birbirleriyle bağlantılı plaklar halinde gruplaşma göstermişlerdir [62]. 20-30 µm çapındaki hepatositler 6 veya daha fazla yüzeyli **(**polihedral) hücrelerdir. Hücre sitoplazmasının eozinofilik özelliğinden dolayı, sitoplazmadaki çok sayıdaki mitokondri ve bir miktar düz endoplazmik retikulum Hematoksilen-eozin (HE) ile boyanır [58]. Hepatositlerin apikal ve bazolateral olmak üzere iki hücresel bölgesi vardır. Bazolateral bölge oldukça fazla sayıda mikrovillus kapsamakta olup, protrombin, fibrinojen ve albümin gibi plazma proteinlerinin salgılanmasına yardımcı olmaktadır. Apikal bölge ise hepatositin bir ekzokrin ürünü olan safranın dışarı çıkmasını engellemek için kenarları tıkayıcı bağlantılarla safra kanalının kenarını sarmaktadır [61]. Karaciğer hücreleri, aminoasit (aa) ve lipidlerin glukoneogenez yoluyla glukoza dönüşümünü sağlar. Karbohidratlar ve lipidler karaciğerde glikojen ve trigliseridler halinde depo edilirler. Aynı zamanda vitaminler için özellikle de A vitamini için en büyük depo yeri karaciğerdir [62].

Karaciğer lobülü poligonal bir doku kitlesi olup, 0.7 x 2 mm boyutundadır. Bu lobüller insanda, birbirleriyle yakın ilişkide olduğundan sınırlarını net biçimde ayırmak zordur. Bazı hayvan gruplarında ise, örneğin domuzda lobüller birbirlerinden bağ dokusu ile ayrıldıklarından sınırları bellidir. Portal alanlar lobüllerin köşe kısımlarında yer alıp; sinirler, safra kanalları, lenf damarları ve kan damarları içeren bağ dokusunu kapsarlar [62]. İnsan karaciğerinin her lobülünde 3-6 portal alan bulunur ve her bir portal alanda bir arteriyol (hepatik arterin bir dalı), bir venül (portal venin bir dalı), bir kanal (safra kanalı sisteminin bir parçası) ve lenfatik damarlar yer alır. Belirtilen bu yapıların tümü bir bağ dokusu kılıfı içerisinde yer almaktadır [58].

Karaciğer lobülü içerisinde yer alan ve duvar tuğlalarına benzer şekilde ışınsal bir dizilim gösteren karaciğer hücre plakları, lobülün çevresinden merkezine doğru yönelim

gösterirler. Duvar arasındaki boşluk kısmında ise karaciğer sinüzoidleri yer alır. Sinüzoidler; kesintili pencereli, düzensiz genişlemiş ve endotel tabakasından oluşmuştur. Endotel hücrelerinin altında disse aralığı denen boşluk hepatositlerle endotel hücrelerini birbirinden ayırmaktadır. Sinüzoidler aynı zamanda endotel hücrelerinin lümenine bakan yüzey bölgesinde yer alan Kupffer hücreleri olarak bilinen makrofajları da içerirler. Kupffer hücreleri karaciğer hücrelerinin %15'ini oluşturup, hemoglobini sindirmek, yaşlanan eritrositleri metabolize etmek, immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamak ve kalın barsaktan portal kana geçen bakterileri yok etme gibi görevleri vardır [58].

Mitokondriyal enzimler olarak bilinen transaminazların klinikte serum alanin amino transferaz (ALT) ve serum aspartat amino transferaz (AST) olmak üzere iki önemli çeşidi vardır. ALT ve AST bütün vücut dokularında bulunmakla birlikte en fazla karaciğer, kalp ve iskelet kasında görülmektedir. Bu enzimlerin serum düzeyleri 0-40 IU/L arasında olup, değerleri *karmen ünitesi* şeklinde belirlenmektedir. Karaciğer yaralanması ile serum enzim düzeylerinin fazlalığı arasında bir ilişki olduğu deneysel bir çalışmada görülmüştür. Alkolik hepatitlerde AST > ALT, akut viral hepatit durumunda ise ALT > AST durumu görülür. AST ve ALT değerleri, tıkanma ve kolestatik sarılık durumlarında 200-300 üniteye kadar ve yine siroz olgularında ise 1-1.5 kat artış gösterebilmektedir.

Karaciğer ve böbreklerde oldukça yüksek oranda bulunan gama glutamil transpeptidaz (GGT) karaciğer rahatsızlıklarında hassas ve spesifik bir enzim olup, hepatobiliyer fonksiyon bozukluğunun iyi bir belirtecidir. Karaciğer, böbrekler, plasenta, barsaklar ve kemik gibi dokularda bulunan alkalen fosfataz (ALP) normal serumda karaciğer kökenlidir. Hepatosellüler yetmezlik ve kolestatik sarılık durumlarında seviyesi artabilmektedir. Yaşlı bireylerde (%20) ALP artışı genç bireylere (%2-5) oranla çok fazladır [63].

Karaciğerin görevlerinden biri de safra salgılamaktır. Karaciğerin safra salgılaması iki basamakta gerçekleşir. İlk olarak karaciğer hücreleri tarafından; lesitin, bilirubin, normal plazma elektrolitleri, safra tuzları ve kolesterolden oluşan safranın üretilmesi sağlanır. İkinci bölümde ise oluşturulmuş safra önce interlobüler septumlara ve ardından da safra kanallarına geçer ve bu geçme esnasında salgıya bikarbonat ve sodyum iyonları da eklenmiş olur. Böylece oluşan safra salgısı ya safra kesesinde depolanır ya da duodenuma dökülür [64,65]. Oluşturulan safranın iki önemli görevinden birincisi; yağların emilim ve

sindiriminde, safra asitleri aracılığıyla yağları küçük bölümlere dağıtarak pankreas lipazı tarafından parçalanmasına yardım etmektir. İkinci görevi ise; yıkılım ürünleri olan bilirubin ve kolesterolün atılımını gerçekleştirmektir [64].

1.3. Salusin'lere Genel Bakış

Bu çalışmada yeni keşfedilmiş salusin peptidlerinin beyin ve karaciğer dokularında MetS'e bağlı olarak nasıl değiştiği inceleneceğinden, tezin bu kısmında salusin'lerle ilgili genel bilgilere yer verilecektir.

Shichiri ve arkadaşları 2003 yılında salusin adını verdikleri biyoaktif peptid yapılı bir hormonu keşfettiklerini dünyaya duyurdular [66]. Çok fonksiyonlu bu biyoaktif peptid gerek idrarda, gerek kanda ve gerekse dokularda salusin-α (Sal-α) ve salusin-β (Sal-β) olmak üzere iki formda bulunmaktadır [67-69]. Sal-α 28 aa'dan oluşurken, Sal-β 20 aa'dan oluşmaktadır [66]. Sal-β düz kas hücreleri ve fibroblastlarda büyüme ile ilgili genlerin ekspresyonunu indüklemektedir [70]. Sal-α'nın sıçanlarda Sal-β'ye benzer etkilere sahip olduğuna dair deneysel kanıtlar mevcuttur. Bu iki peptidin biyolojik sistemlerde en önemli görevi; hipotansif etki yaratarak, arterial basıncın düşürülmesi yani tansiyonun düşmesine neden olmalarıdır [66].

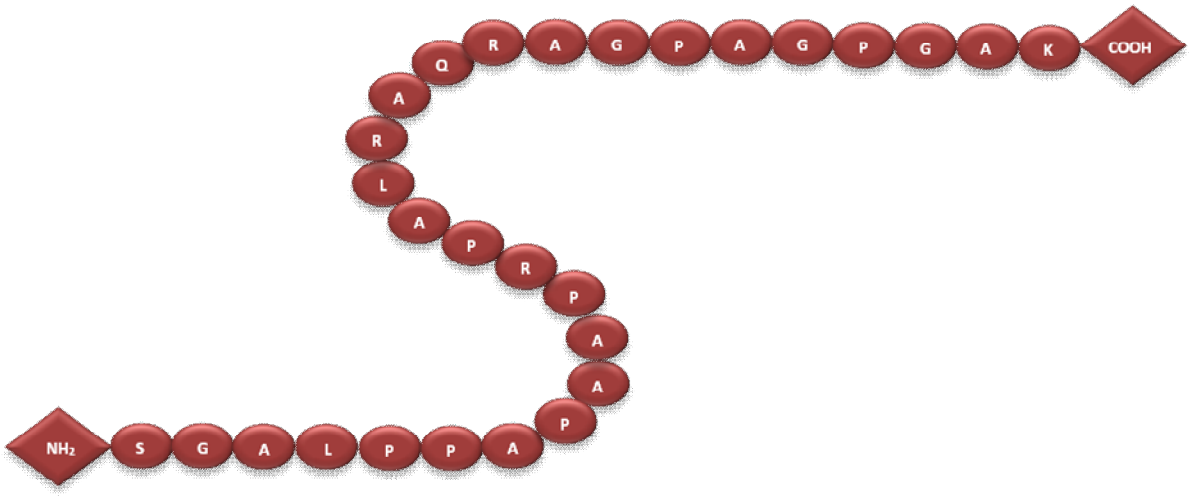
Her iki hormon da preprosalusin'den köken almıştır. Salusin'lerin sıçanların; ince barsak, mide, adrenal medulla, timüs, lenf nodu, dalak, kemik iliği, safen [71], beyin ve karaciğer gibi birçok organında çok iyi eksprese edildiği [69] ancak; tükürük bezi, akciğer, iskelet kası, testis, kalp, aort ve adrenal korteks gibi organlarında ise az miktarda sentezlendiği immünohistokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir [67,68,71,72].

1.3.1. Salusin-α

Preprosalusin'den [71] köken alan Sal-α 28 aa'dan oluşmaktadır [66]. Sal-α'nın aa dizisi; glutamin (1), lizin (1), serin (1), lösin (2), arjinin (3), glisin (4), prolin (7) ve alanin (9) olmak üzere sekiz farklı aa'nın bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Bu peptid (olgun

peptid) %3.57 glutamin, %3.57 lizin, %3.57 serin, %7.14 lösin, %10.71 arjinin, %14.28 glisin ve %25 prolin ihtiva etmektedir [73].

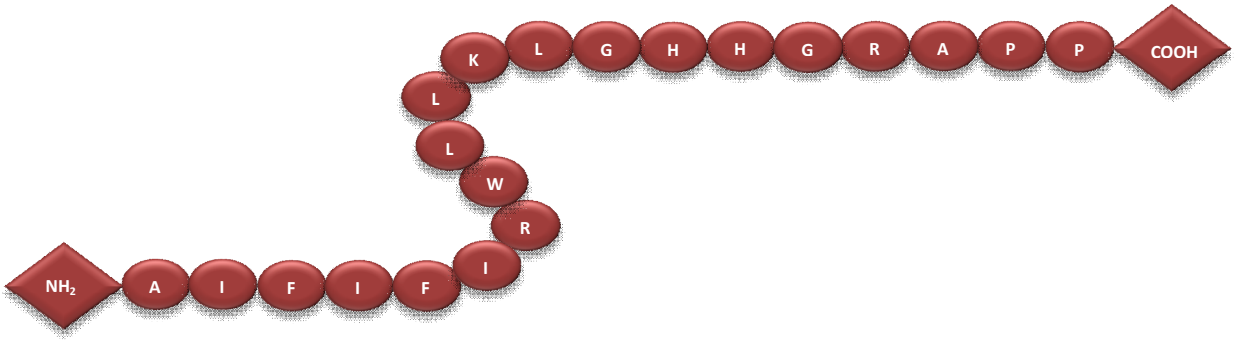
Peptid, koroner arter hastalıkları ile ilişkili olup; sensitivitesi %82, spesitivitesi %93 olarak bildirilmiş, ölçüm sınır değeri ise 8.5 pmol/L'den daha düşük olarak kaydedilmiştir. Bu veriler, Sal-α'nın koroner arter hastalıkların tespitinde önemli bir belirteç olduğunu göstermektedir [74]. Orta dereceli hipertansiyonu olan hastalarda Sal-α düzeyleri sağlıklı kontrollere göre azalmaktadır [75]. Sal-α, gerek insan ve gerekse sıçanların vasküler düz kas hücrelerinde (*Vascular Smooth Muscle Cell*: VSMC) mitojenik etkiye sahiptir. Yani bu dokularda mitozu hızlandırmaktadır [66]. Orta derecedeki hipertansiyonu olan hastalarda serum Sal-α düzeylerinin angina pektoris ve post miyokardiyal inferktüs geçiren hastalardan daha düşük bulunmuştur [75]. Serum Sal-α seviyeleri plak skoru ile uyumlu bir şekilde azalmakta [74] olup, makrofaj köpük hücre formasyonu Sal-α tarafından baskılanmaktadır. Sal-α'nın verilmesi köpük hücre formasyonunu baskılayarak [75] aterosklerotik lezyonları azaltmaktadır [76]. Yukarıda belirtildiği gibi kardiyovasküler sistem üzerine etkili peptidlerden olan Sal-α'nın beyin ve karaciğerde sentezlendiğine dair çalışmalar bulunmasına rağmen, MetS'in bu dokularda nasıl etki ettiğine dair henüz deneysel veriler bulunmamaktadır.



Şekil 1.4. Salusin-α'nın amino asit dizilimi (28 aa)
A: Alanin. G: Glisin. K: Lizin. L: Lösin. P: Prolin. Q: Glutamin. R: Arjinin. S: Serin.

1.3.2. Salusin-β

Sal-α ile karşılaştırıldığında; idrar ve dolaşımdaki seviyeleri 2-10 kat fazla olan Sal-β'nin [71,77] mitojenik etkisi de daha kuvvetlidir. Makrofaj köpük hücre formasyonunu hızlandıran Sal-β'nin; monosit ve makrofajlardan sekresyonu, *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF-α) ve lipopolisakkarid gibi inflamator sitokinler tarafından stimüle ettiği bildirilmiştir [70]. Sal-β'nın anestezi uygulanmış sağlıklı sıçanlara intravenöz bolus enjeksiyonu; sistemik vasküler rezistansı etkilemeksizin hipotansiyon ve bradikardiye eşlik eden sürekli, hızlı ve derin bir şekilde aortik akıma sahip olmaktadır [78]. Deneysel çalışmalarda kullanılan polipropilen ve polistiren özellikteki tüplerin yüzeyine kolayca yapışan Sal-β'nin miktarları azalmaktadır. Dolayısıyla Sal-β ile ilgili araştırmalar daha çok fizikokimyasal olayları kapsamaktadır. Tüm bunlara rağmen deneysel veriler 20 aa'dan oluşan Sal-β'nin [66] preprosalusinden köken aldığını [71] ve aa dizisinin; lizin (1), triptofan (1), alanin (2), arjinin (2), fenilalanin (2), glisin (2), histidin (2), prolin (2), izolösin (3) ve lösin (3) olmak üzere on farklı amino asidin bir araya gelmesiyle oluştuğunu kanıtlamaktadır. Bu peptid (olgun peptid) %5 lizin, %5 triptofan, %10 alanin, %10 arjinin, %10 fenilalanin, %10 glisin, %10 histidin, %10 prolin, %15 izolösin ve %15 lösin içermektedir [79].



Şekil 1.5. Salusin-β'nın amino asit dizilimi (20 aa)
A: Alanin. F: Fenilalanin. G: Glisin. H: Histidin. I: İzolözin. K: Lizin. L: Lösin. P: Prolin. R: Arjinin. W: Triptofan.

1.3.3. Salusin-α ve Salusin-β'nın Amino Asit Dağılımları

Alifatik aa'ler; alanin, glisin ve lösin, bazik aa'ler; arjinin ve lizin ile polar yüksüz aa olan prolin hem Sal-α hem de Sal-β'nin yapısında bulunduklarından ortak amino asitlerdir. Polar yüksüz aa'lerden; glutamin ve serin sadece Sal-α'nın yapısında yer almaktadır. Aromatik aa'ler; fenilalanin ve triptofan, bazik aa; histidin ve alifatik aa; izolösin ise sadece Sal-β'nin yapısında yer almaktadır. (Tablo 1.3). [73,80].

Tablo 1.3. Salusin-α ve salusin-β'nın amino asit dağılımı ve % oranları

	Aminoasitler	Salusin aa sayıları		Salusin aa % benzerlikleri	
		α	β	α	B
Ortak olanlar	Alanin	9	2	32.14	10
	Arjinin	3	2	10.71	10
	Glisin	4	2	14.28	10
	Lizin	1	1	3.57	5
	Lözin	2	3	7.14	15
	Prolin	7	2	25	10
Ortak olmayanlar	Fenilalanin	-	2	-	10
	Glutamin	1	-	3.57	-
	Histidin	-	2	-	10
	İzolözin	-	3	-	15
	Serin	1	-	3.57	-
	Triptofan	-	1	-	5

1.3.4. Salusin-α ve Salusin-β'nın Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkileri

Tablo 1.4. Salusin-α ve salusin-β'nın fizyolojik ve biyokimyasal etkilerinin karşılaştırılması

Etki	Sal-α	Sal-β
Makrofaj köpük hücre formasyonunu	Baskılar	Uyarır
Mitojenik etki	Az	Çok
Salusin-β infüzyonu	-	Aterosklerotik lezyonları arttırır
Salusin-α infüzyonu	Aterosklerotik lezyonları azaltır	-
İdrarda ve dolaşımdaki konsantrasyon	*	*
Rat kardiyomiyozitlerinde hipertrofiyi indükleyerek büyümeyi başlatma	Var	Var
Hidrofobik amino asit residüsü	Az	Çok
Romatolojik hastalıklarda TNF-α'nın artışında	Biraz artar	Çok artar

*: Salusin-β'nın idrarda ve dolaşımdaki seviyeleri salusin-α'dan 2-10 kat daha fazladır.

Yaptığımız geniş literatür taramasında beyin ve karaciğer dokularının salusinleri sentezlediğini fakat bu organlardaki salusin ekspresyonlarının MetS'e bağlı olarak nasıl değişim gösterdiği konusunda deneysel veriler bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu tezdeki temel amaçlarımız;

1) Diyetle indükleyerek MetS oluşturulan sıçanların serumlarında Sal-α ve Sal-β ekspresyonlarının nasıl değiştiğini ve aralarında bir ilişkinin olup olmadığını *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yöntemi ile,

2) Bu sıçanların serumlarındaki Sal-α ve Sal-β peptidlerinin, otoanalizörle analiz edilen ASG ve lipit profili (HDL-K, LDL-K, VLDL-K, TK, TG) parametreleriyle ilişkilerinin olup olmadığını,
3) Bu sıçanların beyin ve karaciğer dokularında Sal-α ve Sal-β ekspresyonlarının nasıl değiştiğini ve aralarında bir ilişkinin olup olmadığını *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yöntemi ile,

4) Bu sıçanların beyin ve karaciğer dokularında Sal-α ve Sal-β ekspresyonlarının lokalizasyonlarını immünohistokimyasal (İHK) yöntem ile, ortaya çıkarmaktır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Deney Hayvanları ve Diyet Protokolü

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 29.12.2011 tarih ve 147 sayılı kararla etik kurul onayı alındıktan sonra, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi (FÜDAM) laboratuarlarında başlatıldı. Deneyde kullanılan 35–40 günlük 159–180 gram ağırlığındaki 14 adet *Sprague-Dawley* türü erkek sıçan, kontrol (K) ve MetS olmak üzere rastgele 2 gruba (n: 7) ayrıldı. Bir haftalık alışma süresini tamamlayan sıçanların boy uzunlukları ve vücut ağırlıkları ölçülerek bazal vücut kitle indeksi (VKİ) değerleri kaydedildi. VKİ ölçümleri diyet süresi tamamlanıncaya kadar 2 haftalık aralıklarla tekrarlandı. Diyet aşamasında ortam ısısı otomatik olarak düzenlenen 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortamda tutulan sıçanlar, 8 mm'lik standart sıçan pellet yemi ile *ad libitum* olarak beslendi. Pellet yem karışımı; metabolik enerji 2650 kcal/kg, ham protein (minimum) %24, ham kül (maksimum) % 8, ham selüloz (maksimum) %7, HCl'de çözünmeyen kül (maksimum) %2, mineral karması [Kalsiyum (%1 – 2.8), Fosfor (%0.9), Sodyum (%0.5 – 0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg)] %1.25, vitamin karması [Vitamin A (300 IU/kg), Vitamin D3 (1000 IU/kg), Vitamin E (60 mg/kg), Vitamin B2 (4 mg/kg)] %1.25, NaCl (maksimum) %1 ve sudan (maksimum) %12 oluşmaktadır [80]. Su ihtiyaçlarını karşılamak için kontrol grubundaki sıçanlara normal su verilirken, MetS grubundaki sıçanlara %10'luk fruktoz çözeltisi *ad libitum* olarak verildi.

2.2. Sıçanlarda Vücut Kitle İndeksinin Hesaplanması

Bir dizi metabolik patolojinin birlikte gözlendiği MetS kriterleri arasında en önemli belirteç olan obezitenin belirlenmesi amacıyla, WHO tarafından da geçerliliği onaylandığı için VKİ ölçülmektedir. Sıçanlarda VKİ ölçümü Şekil 2.1'de gösterilen formülle belirlenmektedir. Darası alınmış kapaklı plastik bir kapta tartılarak vücut ağırlığı tespit edildikten sonra boy uzunluğunun belirlenmesi için burun ucundan kuyruk ucuna kadar

olan mesafe ölçüldü. Sıçanlarda obezite tespiti için kullanılan VKİ değerleri kontrol grubu için VKİ= 0.72 g/cm^2, obez grubu için ise VKİ ≥ 1.00 g/cm^2 dir [81].

- VKİ (g/cm^2) = vücut ağırlığı / boy uzunluğu^2

Şekil 2.1. Sıçanlarda vücut kitle indeksi formülü.

2.3. Sıçanlarda MetS Tanı Kriterleri

Çeşitli çalışma grupları tarafından farklı zamanlarda belirlenen MetS tanı kriterleri arasında nispi bir konsensüs göstermesi bakımından, MetS tanısı için bu çalışmada ATP III kriterleri esas alındı. Abdominal obezitenin esas alındığı ATP III kriterlerine göre MetS tanısında kullanılan parametreler şunlardır; bel çevresi erkeklerde ≥ 102 cm, kadınlarda ise ≥ 88 cm, veya insanlarda VKİ ≥ 30 kg/m^2; ratlarda VKİ ≥ 1.00 g/cm^2, dislipidemi (Trigliserid ≥ 150 mg/dL, HDL-K; erkeklerde ≤ 40 mg/dL, kadınlarda ≤ 50 mg/dL), APG ≥ 110 mg/dL ve kan basıncı (≥ 130/85 mmHg veya hipertansiyon tedavisi uygulanması). Yukarıda referans aralıkları belirtilen bu faktörlerin, herhangi üçünün bir arada olması ATP III kriterleri için yeterli olmaktadır [26]. Bu çalışmada ASG, HDL-K ve VKİ değerlerine bakılarak MetS'in oluşup oluşmadığına karar verildi.

2.4. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması

Sıçanlar, alışma süresinden sonra başlatılan 12 haftalık diyet programının bitiminde sakrifiye edildi. Elde edilen kanlar iki farklı deney tüpüne alındı. Kanların bir grubu düz biyokimya tüplerine, diğer grubu ise içinde 500 *Kallikrein Inhibitor Unit* (KIU) aprotinin/mL [82] ve 10 µl Tween-20 [83] içeren biyokimya tüplerine eşit olarak paylaştırıldı. Örnekler oda ısısında 1792 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Aprotinin içermeyen serum örneklerinde biyokimyasal parametreler çalışılırken, aprotinin ve Tween-20'li tüplerde Sal-α ve Sal-β peptidleri çalışıldı [82,83]. Elde edilen serumlar analiz edilinceye kadar -80°C'de saklandı.

Beyin ve karaciğer dokuları sal-α ve sal-β konsantrasyonlarının tespiti ve İHK boyamalar için iki gruba ayrıldı. İHK boyamalarında kullanılacak doku örnekleri hemen % 10'luk formaldehit içine alındı. Peptidlerin analizinde doku konsantrasyonlarını belirlemek için tartılan 50-100 mg'lık doku örnekleri eppendorf içerisinde kaynayan suda 5 dakika bekletilerek proteazların sal-α ve sal-β'yi denatüre etmesi önlendi [84,85]. Kaynatılan doku örnekleri, içerisinde 5-10 mL % 5 w/v fosfat tampon çözeltisi [(*Phosphate Buffer Saline* (PBS)] bulunan düz biyokimya tüplerine alındı. burada bir cam baget yardımıyla homojenize edildikten sonra +4°C'de 1792 x g'de 10 dakika santifüj edildi. Elde edilen süpernatantlara 500 KIU aprotinin/mL ve 10 µl Tween-20 içeren eppendorf tüplere aktarıldı. Bu şekilde elde edilen doku süpernatantları peptid analizi yapılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

2.5. Alet, Cihaz ve Kimyasallar

Analiz aşamalarında Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları ile Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi (Ankara), Biyokimya Laboratuvarı kullanıldı.

2.5.1. Kullanılan Alet, Cihaz ve Sarf Malzemeler

Alet, Cihaz veya Sarf Malzeme	**Marka-Model ve Üretildiği Ülke**
• Buzdolabı	(Arçelik 5092NF, Ankara, Türkiye)
• Çalkalayıcı (*orbital shaker*)	(Oxoid ltd. RS911, Basingstok Hants, İngiltere)
• Deney tüpü	[(Borosilikat,(12 x 75 mm)]
• Derin dondurucu	(Arçelik 2573D, Türkiye)
• ELISA okuyucu	(ELX800, Biotek Instruments, Winooski, Vermont, ABD)
• ELISA yıkayıcı	(ELX50, Biotek Instruments,

	California, ABD)
• Eppendorf tüp	[(ETPP 0004 (polypropylene), İsolab laborgeräte, GmbH, Almanya)]
• Etüv	(Nüve FN400, Türkiye)
• Fotoğraf Makinesi	(Olympus DP71, Almanya)
• Mavi pipet ucu	(İsolab laborgeräte, GmbH, Almanya)
• Mikrodalga ısıtıcı	(Arçelik MD 820, Türkiye)
• Mikroskop	(Olympus BX51, Almanya)
• Mikrotom	(Leica RM 2255, Microsystems nussloch GmbH, Almanya)
• Otoanalizör	Konelab 60 ve İmmulite 2000 (EMA Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA)
• Otomatik pipet	[(Biohit proline (100 ve 1000 µl)]
• Parafin takip cihazı	(Shandon Cryotome SME 77200101, İngiltere)
• pH metre	(Thermo Electron Corporation, Orion 3 star pH Benchtop, ABD)
• Polilizinli lam	(Bayer Türk Kimya San LTD. ŞTİ, İstanbul, Türkiye)
• Santrifüj	(Hettich Universal K2S,Tuttlingen, Almanya)
• Sarı pipet ucu	(İsolab laborgeräte, GmbH, Almanya)
• Su banyosu	(Nüve BM402, Türkiye)
• Vorteks	(Nüve MN110, Türkiye)

2.5.2. Kullanılan Kimyasallar

- Aprotinin (Trasylol) (Bayer Türk Kimya San LTD. ŞTİ, İstanbul, Türkiye)
- Formaldehit (GBL, Rosachem, İstanbul, Türkiye)
- Fosfat tamponu [(Lab Vision (Thermo Fisher Scientific) Katalog no: TA-125-PT, HR, WA7 1TA, UK)]
- Streptavidin peroxidase [(Lab Vision (Thermo Fisher Scientific) Katalog no: TS-125-HR, WA7 1TA, UK)]
- Biotinylated Goat Anti-Mouse [(Lab Vision (Thermo Fisher Scientific). Katalog no: TM-125-BN, WA7 1TA, UK)]
- AEC kromojen [(Lab Vision Corporation Katalog no: TA-125-HA, WA7 1TA, UK)]

2.5.3. Kullanılan Kit ve Antikorlar

Tablo 2.1. Kullanılan Kit ve Antikorlar

Kit / antikor	**Üretici firma**	**Katalog no**	**Yöntem**
Sal-α kiti	Uscn Life Science Inc. Wuhan	E91892	ELISA
Sal-β kiti	Uscn Life Science Inc. Wuhan	E2026	ELISA
Sal-α doku antikoru	Phoenix Pharmaceuticals	H-010-67	İHK
Sal-β doku antikoru	Phoenix Pharmaceuticals	H-010-68	İHK

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. İHK: İmmünohistokimya. Sal-α: Salusin-α. Sal-β: Salusin-β.

2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi

Sakrifikasyondan sonra açlık serum glukoz (ASG) miktarları hemen çalışıldı. Derin dondurucuda -80°C'de bekletilen aprotinin içermeyen diğer biyokimyasal parametreler ise soğuk zincir ile Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuarına (Ankara) gönderilerek çalışıldı. Bu laboratuarda otoanalizörle ölçümü yapılamayan LDL-K değerleri Friedewald formülü ile hesaplandı. Bu formüle göre; LDL-K: TK – (HDL-K + VLDL-K) ve VLDL-K: Trigliserid / 5 bağıntısı esas alınmaktadır [86]. Konelab 60 marka otoanalizör kullanılarak; ALT, ASG, AST, HDL-K, GGT, TG, TK ve TP düzeylerinin analizi yapıldı. Açlık serum insülin (ASİ) düzeyi ise İmmulite 2000 otoanalizör kullanılarak üretici firmanın önerdiği kitler kullanılarak belirlendi.

2.7. ELISA Yönteminin İlkesi

Özgül antijen ve antikorların reaksiyona girerken antikorlara *Horseradish Peroxidase (*HRP*)* ya da alkalen fosfataz gibi enzimler bağlanarak oluşturulan yönteme ELISA (EİA) adı verilmektedir. Yöntemin çalışma prensibi, miktarı araştırılan antijenler ile tepkime verebilen (belirli enzimlerle işaretlenmiş) antikorların mikroplak kuyucuklarına yerleştirilmesi sonucu özgül antijen-antikor tepkimelerinin başlamasına dayanmaktadır [87]. Ortamda bulunan işaretli enzim substratla tepkimeye girerek substratı parçalamakta, sonuçta ortaya çıkan renkli görüntü araştırılan maddenin (antijen) varlığını göstermektedir. Bu işlemlerin sonunda oluşan renkli ürün ELISA cihazında değerlendirilerek ölçümler alınmaktadır [87].

2.8. Salusinlerin Analizleri

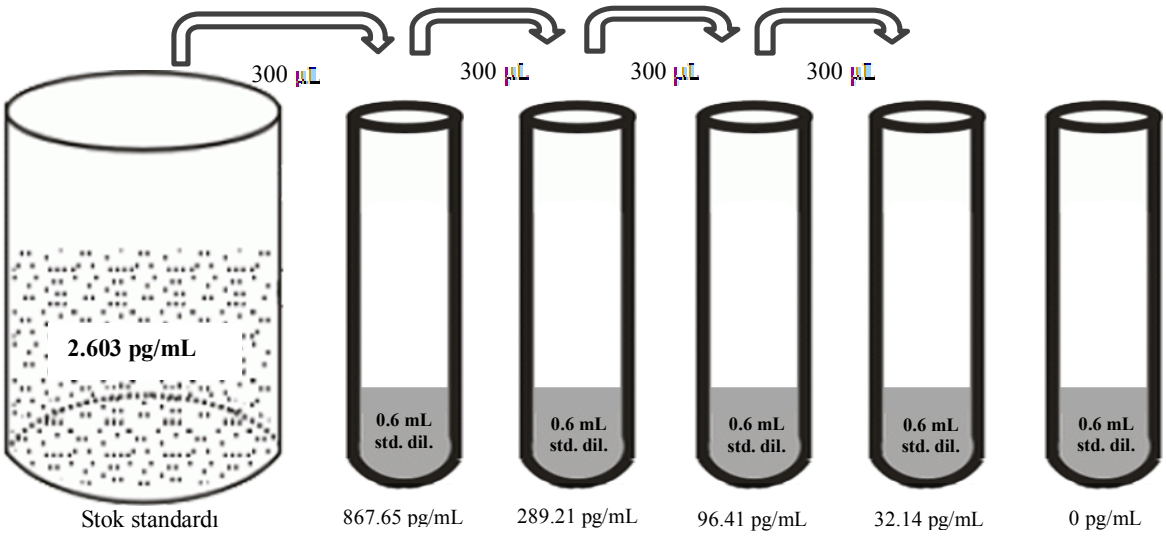
Kitlerin ölçüm geçerlilik deneyleri Dr. Aydın'ın daha önce belirttiği şekilde test edilmiştir [88]. Yapılan geçerlilik deneyinde; geri kazanım, ölçüm aralığı, sensitivite, linearite, gün içi değişim (intra-assay) ve günler arası değişim (inter-assay) değerleri belirlenmiştir.

2.8.1. Salusin-α Düzeyi

2.8.1.1. Hazırlık

Standart ve Diluentlerin Hazırlanışı

1. Stok çözeltideki standart konsantrasyonu 1.000 pmol/L (2.603 pg/mL) olan Sal-α kiti açılıp içerisine 1 mL standart diluent eklenerek çözüldü. Böylece stok standardı oluşturuldu. Çözeltinin sağlıklı bir şekilde karışımı için 10 dakika oda ısında bekletildi.
2. Deney tüpleri ilk tüpten başlamak üzere sırasıyla; SA1 (standart-α 1), SA2, SA3, SA4 ve SA5 olarak etiketlendi. Her bir tüpe 0.6 mL standart diluent eklendi.
3. Hazırlanan stok standardından 300 µL alınarak SA1'e aktarılarak karıştırıldı
4. SA1'deki çözeltiden 300 µL alınarak SA2'ye aktarılarak karıştırıldı. Bu işlem basamakları devam ettirilerek beş tüpü kapsayan dilüsyon dizisi oluşturuldu.



Şekil 2.2. Salusin-α standart çözeltisinin hazırlanması

Assay Diluent A ve B'nin Hazırlanışı

Assay Diluent A'dan 6 mL alınıp üzerine distile sudan 6 mL eklenerek 12 mL dilüe edilmiş *Assay Diluent A* hazırlandı. *Assay Diluent B*'den 6 mL alınarak üzerine distile

sudan 6 mL eklenerek 12 mL dilüe edilmiş *Assay Diluent B* hazırlandı. Hazırlanan bu karışımlar dondurulmadı.

Detection Reagent A ve B'nin Hazırlanışı

Detection Reagent A ve *Detection Reagent* B, çalışmaya başlamadan önce santrifüj edildi. Hazırlanan *Assay Diluent A*, *Detection Reagent A* ile; *Assay Diluent B* ise *Detection Reagent B* ile 1/100 oranında dilüe edildi.

Yıkama Çözeltisinin Hazırlanışı

Konsantre yıkama solüsyonundan 20 mL alınıp üzerine 580 mL distile su eklenerek dilüe edildi. Böylece 600 mL yıkama çözeltisi hazırlandı.

TMB Substratın Hazırlanışı

TMB substrat şişe içerisinde hazır olduğundan herhangi bir işlem yapılmadı. Bu substratta kolaylıkla bulaşma olabileceğinden ışıktan korunması sağlandı.

2.8.1.2. Analiz

Pleytteki kuyucuklara sırasıyla şu işlemler uygulandı; ilgili kuyucuklara 50 µL örnek ve standart konuldu. Tüm kuyucuklara 50 µL *Detection Reagent A* eklendi. 37 ^{o}C'de 1 saat inkübasyon yapıldı. 350 µL yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkandı ve son yıkamanın ardından pleyt ters çevrilip kurulandı. Kuyucuklara 100 µL *Detection Reagent B* konuldu. 37 ^{o}C'de 30 dakika inkübasyon yapıldı. Kuyucuklar 350 µL yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandı ve son yıkamanın ardından pleyt ters çevrilip kurulandı. Kuyucuklara 90 µL TMB substrat (TMB-S) konuldu. 37 ^{o}C'de 15-25 dakika karanlıkta inkübasyon yapıldı. Kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu konuldu. Kuyucukların bekletilmeden ELISA cihazında 450 nm'de ölçümleri yapıldı (ELX800 ELISA okuyucu cihazı sonuçları otomatik olarak hesaplamakta olup, sonuçların ortalamaları cihaz tarafından verilmektedir).

Salusin-α Analizinin Özeti

- 50 µL ilgili örnek ve standart.
- 50 µL *Detection Reagent A*.
- 37 ^{o}C'de 1 saat inkübasyon.
- 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama.
- 100 µL *Detection Reagent B*.
- 37 ^{o}C'de 30 dakika inkübasyon.
- 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama.
- 90 µL *TMB substrat* (mavi renk oluşumu).
- 37 ^{o}C'de 15-25 dakika karanlıkta inkübasyon.
- 50 µL stop solüsyonu (sarı renk oluşumu).
- 450 nm'de ELISA cihazında okutma.

2.8.2. Salusin-β Düzeyi

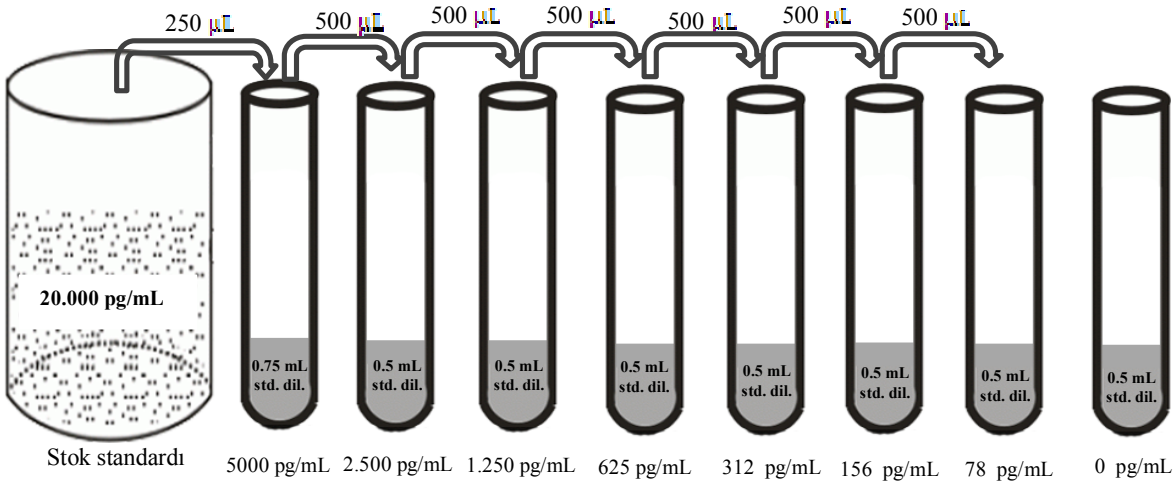
2.8.2.1. Hazırlık

Standart ve Diluentlerin Hazırlanışı

1. Stok çözeltideki standart konsantrasyonu 20.000 pg/mL olan Sal-β kiti açılarak içerisine 1 mL standart diluent eklenerek çözüldü. Böylece stok standardı oluşturuldu. Çözeltinin sağlıklı bir şekilde karışımı için 10 dakika oda ısında bekletildi.

2. İlk tüpten başlamak üzere sırasıyla SB1 (standart-β 1), SB2, SB3, SB4, SB5, SB6, SB7 ve SB8 olarak etiketlendi. Birinci tüpe 0.75 mL, kalan 7 tüpün her birine 0.5 mL standart diluent eklendi.

3. Hazırlanan stok standardından 250 µL alınarak SB1'e aktarılarak karıştırıldı. SB1'deki çözeltiden 500 µL alınarak SB2'ye aktarılarak karıştırıldı. Bu işlem basamakları devam ettirilerek sekiz tüpü kapsayan dilüsyon dizisi oluşturuldu.



Şekil 2.3. Salusin-β standart çözeltisinin hazırlanması

Serum Örneklerinin Hazırlanışı

Serum örnekleri 0.02 Molarlık (pH: 7.0-7.2) PBS ile 200 kat dilüe edildi.

Assay Diluent A ve B'nin Hazırlanışı

Assay Diluent A'dan 6 mL alınıp üzerine deiyonize sudan 6 mL eklenerek dilüe edilmiş 12 mL *Assay Diluent A* hazırlandı. *Assay Diluent B*'den 6 mL alınarak üzerine deiyonize sudan 6 mL eklenerek dilüe edilmiş 12 mL *Assay Diluent B* hazırlandı. Hazırlanan bu karışımlar dondurulmadı.

Detection Reagent A ve B'nin Hazırlanışı

Detection Reagent A ve *Detection Reagent B*, çalışmaya başlamadan önce santrifüj edildi. Hazırlanan *Assay Diluent A*, *Detection Reagent A* ile, *Assay Diluent B* ise *Detection Reagent B* ile 1/100 oranında dilüe edildi.

Yıkama Çözeltisi Hazırlanışı

Konsantre yıkama solüsyonundan 20 mL alınıp üzerine 580 mL distile su eklenerek sulandırıldı. Böylece 600 mL yıkama çözeltisi oluşturuldu.

TMB Substratın Hazırlanması

TMB substratı şişesi içerisinde hazır olarak bulunduğundan herhangi bir işlem yapılmadı. Bu substratta kolaylıkla etkilenme olabileceğinden ışıktan korundu.

2.8.2.2. Analiz

Pleytteki kuyucuklara sırasıyla şu işlemler uygulandı; ilgili kuyucuklara 100 µL örnek ve standart konuldu. 37 ^{o}C'de 2 saat inkübasyon yapıldı. Kuyucuklardaki örnek ve standartlar döküldü ancak yıkama yapılmadı. Kuyucuklara 100 µL *Detection Reagent A* konuldu. 37 ^{o}C'de 1 saat inkübasyon yapıldı. Kuyucuklar 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı ve son yıkamanın ardından pleyt ters çevrilip kurulandı. Kuyucuklara 100 µL *Detection Reagent B* konuldu. 37 ^{o}C'de 30 dakika inkübasyon yapıldı. Kuyucuklar 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Kuyucuklara 90 µL TMB substrat solüsyonu konuldu. 37 ^{o}C'de 15-25 dakika karanlık ortamda inkübasyon yapıldı. Reaksiyonu durdurmak için kuyucuklara 50 µL stop solüsyonu eklendi. Kuyucuklar bekletilmeden ELISA cihazında 450 nm'de ölçümleri yapıldı.

Salusin-β Analizinin Özeti

- 100 µL ilgili örnek ve standart.
- 37 ^{o}C'de 2 saat inkübasyon.
- 100 µL *Detection Reagent A*.
- 37 ^{o}C'de 1 saat inkübasyon.
- 350 µL yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama.
- 100 µL *Detection Reagent B*.
- 37 ^{o}C'de 30 dakika inkübasyon.
- 350 µL yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkama.
- 90 µL *TMB substrat* (mavi renk oluşumu).
- 37 ^{o}C'de 15-25 dakika karanlıkta inkübasyon.
- 50 µL stop solüsyonu (sarı renk oluşumu).
- 450 nm'de ELISA cihazında okutma.

2.9. İmmünohistokimyasal Analizler

2.9.1. İmmünohistokimyasal Yöntemin İlkesi

Dokularda antijen olarak bilinen maddelerin İHK metoduyla belirlenmesi, ilk olarak 1941'de Coons ve ark. [89] tarafından yapılmıştır. İHK; immünolojik ve histolojik teknikleri birlikte kullanan kompleks bir metottur. Dokularda oldukça az miktarlarda bulunan antijenler İHK metoduyla oldukça güvenilir bir şekilde analiz edilebilmektedir [87].

2.9.2. Deneyin Yapılışı

Beyin ve karaciğer dokularındaki Sal-α ve Sal-β peptitlerinin İHK analizleri; %10'luk formaldehit içerisinde bekletilen doku örneklerinin Hsu ve ark. [90] önerdiği *Avidin-Biotin-peroxidase Complex* (ABC) metodu kullanılarak yapıldı. İHK incelemeler hazırlık ve boyama olarak iki safhada gerçekleştirildi.

2.9.2.1. Hazırlık

Doku Örneklerinin Tespit Çözeltisine Alınışı

Sakrifikasyon işlemiyle elde edilen beyin ve karaciğer doku örnekleri ayrı ayrı kaplarda %10'luk formaldehit içine alındı. Analiz edilinceye kadar oda ısısında saklandı.

Doku Örneklerinin Parafin Bloklara Alınışı

Tespit çözeltisinden çıkarılan beyin ve karaciğer doku örnekleri, rutin parafinizasyon işlemlerinden sonra parafin bloklara yerleştirildi.

Kesitlerin Elde Edilişi

Parafin bloklardan 4 µm kalınlığında alınan doku kesitleri polilizinli lamlara yerleştirildi.

2.9.2.2. Boyama

Kesitlere sırasıyla şu işlemler uygulandı; Etüv içerisinde 80 ^{o}C'de 20 dakika bekletildi. Saf ksilol serilerinden 20 dakika geçirildi (4 x 5'). Etil alkol serilerinden (%99.5 ➲ %96 ➲ %90 ➲ %80 ➲ %70) 15 dakika geçirildi (5 x 3'). Distile suda 10 dakika bekletildi. Metil alkolde hazırlanan % 3'lük H_2O_2'de 10 dakika bekletildi (2 x 5'). Sitrat tampon çözeltisi (%10 Sitrat tampon çözeltisi, pH: 6.0) içinde mikrodalga ısıtıcıda (750 mw) 15 dakika inkübasyon yapıldı. Daha sonra oda ısısında 20 dakika bekletildi. PBS'de 5

dakika bekletildi. HRP *Blocking* ile 10 dakika inkübasyon yapıldı. Doku antikoru (Primer antikor: Sal-α veya Sal-β) ile 38 ^{o}C'de ki su banyosunda 30 dakika inkübasyon yapıldı. PBS'de 5 dakika bekletildi. *Biotinylated Goat Anti-Mouse* ile 38 ^{o}C'de ki su banyosunda 10 dakika inkübasyon yapıldı. PBS'de 5 dakika bekletildi. *Streptavidin Peroxidase* ile 38 ^{o}C'de ki su banyosunda 10 dakika inkübasyon yapıldı. PBS'de 5 dakika bekletildi. *AEC (*3-Amino-9-Ethyl Carbazole) *Chromogen* ile 38 ^{o}C'de ki su banyosunda 10 dakika inkübasyon yapıldı. Distile su içerisinde 1-2 dakika yıkandı. Yıkama suyu süzüldü (kesitlerin bütünüyle kurutulmadı). *Mayers hematoksilen* ile 1-2 dakika kontrast boyama yapıldı. Distile su içerisinde 1-2 dakika yıkandı. Yıkama suyu süzüldü (kesitlerin bütünüyle kurutulmadı). Boyanan kesitlerin üzeri lamelle kapatılarak daimi preparat haline getirildi. Oluşturulan daimi preparatlar ışık mikroskobu ile değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

İHK Boyamaların Özeti

- Etüv (80 ^{o}C) 20 dakika.
- Saf ksilol 5 dakika.
- Saf ksilol 5 dakika.
- Saf ksilol 5 dakika.
- Saf ksilol 5 dakika.
- % 99.5 Etil alkol 5 dakika.
- % 96 Etil alkol 5 dakika.
- % 90 Etil alkol 5 dakika.
- % 80 Etil alkol 5 dakika.
- % 70 Etil alkol 5 dakika.
- Distile su 10 dakika.
- % 3'lük H_2O_2 5 dakika.

- % 3'lük H_2O_2 5 dakika.
- Sitrat tampon çözeltisi (mikrodalga ısıtıcı: 750 mw) 15 dakika.
- Oda ısısı 20 dakika.
- PBS 5 dakika.
- *Horseradish Peroxidase Blocking* 10 dakika.
- Su banyosunda (38 ^oC) primer antikor (Sal-α veya Sal-β) 30 dakika.
- PBS 5 dakika.
- Su banyosunda (38 ^oC) *Biotinylated Goat Anti-Mouse* 10 dakika.
- PBS 5 dakika.
- Su banyosunda (38 ^oC) *Streptavidin Peroxidase* 10 dakika.
- PBS 5 dakika.
- Su banyosunda (38 ^oC) *AEC Chromogen* 10 dakika.
- Distile su 1-2 dakika.
- *Mayers hematoksilen* 1-2 dakika.
- Distile su 1-2 dakika.
- Lamel kapatma.
- Işık mikroskobu ile değerlendirme.
- Fotoğraf çekimi.

2.10. İstatistiksel Analizler

Kontrol ve MetS gruplarında araştırılan parametrelerin istatistiksel analizleri SPSS 10.00 paket programı kullanılarak yapıldı. Çalışma parametreleri standart sapma

miktarlarıyla (ortalama ± standard sapma: *Standart Deviation*: SD) birlikte sunuldu. Hormon değişim oranları noktadan sonra iki basamak şeklinde verildi. İstatistiksel anlamlılığın saptanmasında; tekrarlayan ölçümler için Wilcoxon Rank testi, gruplar arası verilerin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. [87]. Grup içi ilişkiler Pearson Korelasyon testi ile belirlendi. İstatistiksel analizlerde $p \leq 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışmaya 35–40 günlük 14 adet *Sprague-Dawley* türü erkek sıçan dahil edildi. Diyet programı süresince sıçanlarda ölüm saptanmadı. Kontrol ve MetS gruplarından sıçanların diyet programı sonundaki (12. hafta) görünümleri fotoğraf ile sunuldu (Şekil 3.1).

3.1. Vücut Kitle İndeksi Değişimleri

İki haftalık periyotlarda sıçanların VKİ değerleri tespit edildi. Diyet programı başlangıcından itibaren elde edilen VKİ değerleri (Bazal, 2. hafta, 4. hafta, 6. hafta, 8. hafta, 10. hafta ve 12. hafta) tablo halinde sunuldu (Tablo 3.1).



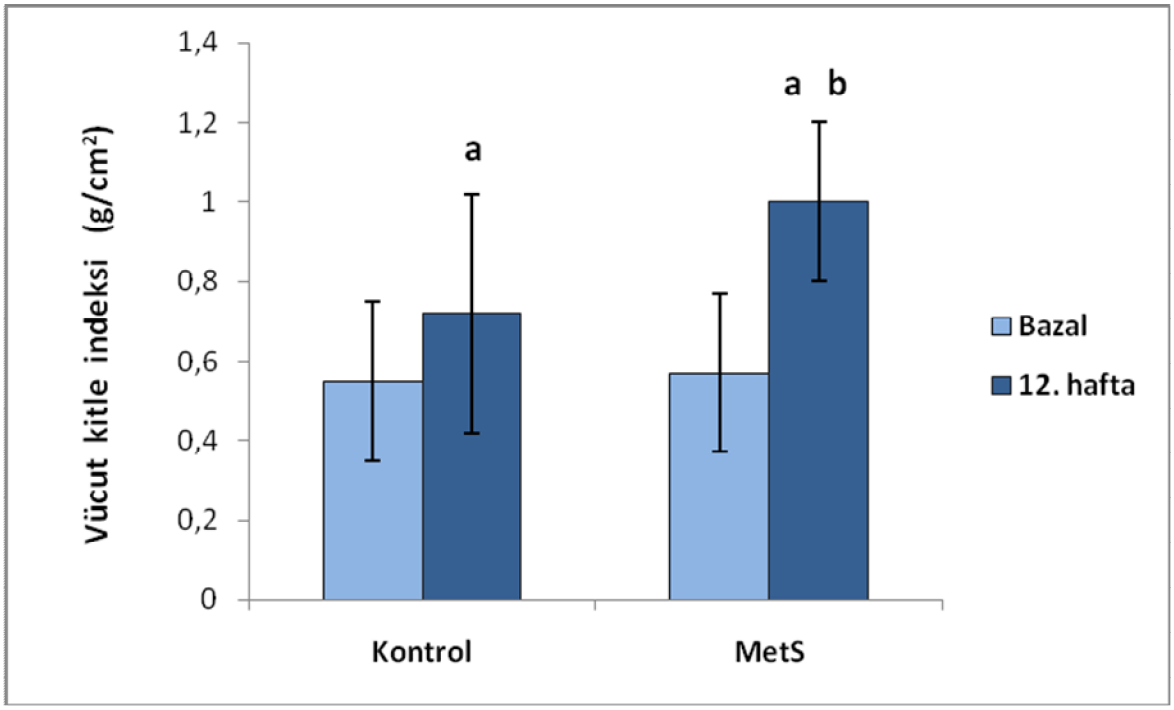
Şekil 3.1. Sıçanların 12. hafta sonunda örnek görünümleri
MetS: Metabolik sendrom.

Diyet programının başlangıcında kontrol ve MetS grubundaki sıçanların VKİ değerleri karşılaştırıldığında; kontrol grubunda 0.55 ± 0.2 g/cm^2, MetS grubunda 0.57 ± 0.2 g/cm^2 olup, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$). Diyet programının sonunda VKİ düzeyleri; kontrol grubunda 0.72 ± 0.3 g/cm^2, MetS grubunda 1.00 ± 0.2 g/cm^2 olup, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) idi. Kontrol ve MetS gruplarında bazal ve 12. hafta sonu VKİ değerleri karşılaştırıldığında; kontrol bazal → kontrol 12. hafta, MetS bazal → MetS 12. hafta, aralarındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$) saptandı. Kontrol ve MetS gruplarındaki sıçanların bazal ve 12. hafta sonundaki VKİ düzeyleri grafik halinde sunuldu (Şekil 3.2).

Tablo 3.1. Sıçanların deney sürecinde vücut kitle indeksi değişimleri

GRUP	**VKİ (g/cm^2)**							***p* değeri**
	Bazal	**2. hafta**	**4. hafta**	**6. hafta**	**8. hafta**	**10. hafta**	**12. hafta**	
K (n:7)	0.55±0.2*	0.57± 0.4	0.59±0.4	0.64±0.3	0.63±0.3	0.68±0.4	0.72±0.3§	0.028 [a]
MetS (n:7)	0.57±0.2$^{\#}$	0.59±0.2	0.63±0.3	0.69±0.2	0.77±0.4	0.89±0.3	1.00±0.2‡	0.027 [a]
***p* değeri**	0.106 [c]	0.226	0.126	**0,019**	**0,004**	**0,004**	**0,004** [b]	–

K: kontrol. MetS: metabolik sendrom
VKİ: Vücut kitle indeksi. *: Kontrol bazal. $^{\#}$: Metabolik sendrom bazal. §: Kontrol 12. hafta. ‡: Metabolik sendrom 12. hafta. a: $\boldsymbol{p < 0.05}$ (* → §; $^{\#}$ → ‡). b: $\boldsymbol{p < 0.01}$ (§ → ‡). c: $p > 0.05$ (* → $^{\#}$).



Şekil 3.2. Sıçanların diyet öncesi ve sonrası vücut kitle indeksi
K: Kontrol. MetS: metabolik sendrom. a: ***p* < 0.05** (K_{bazal} → $K_{12.hafta}$; $MetS_{bazal}$ → $MetS_{12.hafta}$).
b: ***p* < 0.01** ($K_{12.hafta}$ → $MetS_{12.hafta}$).

3.2. Biyokimyasal Parametreler

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MetS grubunda; ALT, ASG, GGT, LDL-K, TK ($p < 0.01$), ASİ, TG ve TP ($p < 0.05$) düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı, AST ve HDL-K ($p < 0.05$) düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptandı. MetS grubunda; VLDL-K düzeylerinin arttığı, artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p > 0.05$) belirlendi. Kontrol ve MetS grubu sıçanlarda saptanan biyokimyasal değerler tablo halinde sunuldu (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Biyokimyasal parametrelerin serum düzeyleri

Parametre	Kontrol (n:7)	MetS (n:7)
ALT (lU/L)	51.33 ± 3.50	65.00 ± 3.16 [b]
ASG (mg/dL)	91.33 ± 6.19	188.67 ± 9.67 [b]
ASİ (μlU/mL)	0.25 ± 0.09	1.08 ± 0.09 [a]
AST (lU/L)	220.17 ± 11.21	202.00 ± 13.16 [a]
GGT (lU/L)	4.47 ± 0.34	5.05 ± 0.29 [b]
HDL-K (mg/dL)	42.67 ± 6.02	32.50 ± 6.41 [a]
LDL-K (mg/dL)	90.00 ± 4.05	133.67 ± 6.28 [b]
TG (mg/dL)	127.33 ± 5.13	130.83 ± 8.18 [a]
TK (mg/dL)	154.67 ± 8.14	195.00 ± 18.98 [b]
TP (mg/dL)	6.50 ± 0.47	7.23 ± 0.29 [a]
ÜA (mg/dL)	6.80 ± 3.30	9.90 ± 2.83
VLDL-K (mg/dL)	24.50 ± 3.27	28.50 ± 5.43

ALT: Alanin aminotransferaz. ASG: Açlık serum glukoz. ASİ: Açlık serum insülin. AST: Aspartat aminotransferaz. GGT: Gamma glutamiltransferaz. HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol. LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol. MetS: Metabolik sendrom. ÜA: Ürik asit. TG: Trigliserid. TK: Total kolesterol. TP: Total protein. VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu kolesterol. a: $p < 0.05$. b: $p < 0.01$.

3.3. Salusin-α ve Salusin-β Değişimleri

Salusin-α ve salusin-β analizleri birbirlerinden bağımsız 3'er deneyin ortalama değerleri kullanılarak kitlerin ölçüm karakteristikleri oluşturulmuştur (Tablo 3.3 ve Tablo 3.4).

Tablo 3.3. Kitlerin sıçan serumlarındaki hormonların ölçüm karakteristikleri

Parametre	Intra-Assay (% CV)	Inter-Assay (% CV)	Geri Kazanım (%)	Ölçüm Aralığı (pg/mL)	Sensitivite (pg/mL)
Sal-α	< 8.1	< % 12.4	97.9	2 – 400	2.0
Sal-β	< 9.3	< % 14.8	102.8	0.10- 500	0.10

Tablo 3.4. Kitlerin doku süpernatantlarındaki hormonların ölçüm karakteristikleri

Parametre	Intra-Assay (% CV)	Inter-Assay (% CV)	Geri Kazanım (%)	Ölçüm Aralığı (pg/mL)	Sensitivite (pg/mL)
Sal-α	< 9.5	< % 11.8	106.2	2 – 400	2.0
Sal-β	< 9.8	< % 15	91.6	0.10- 500	0.10

CV: Değişim katsayısı (*Coefficient of variation*). Sal-α: Salusin-α Sal-β: Salusin-β.

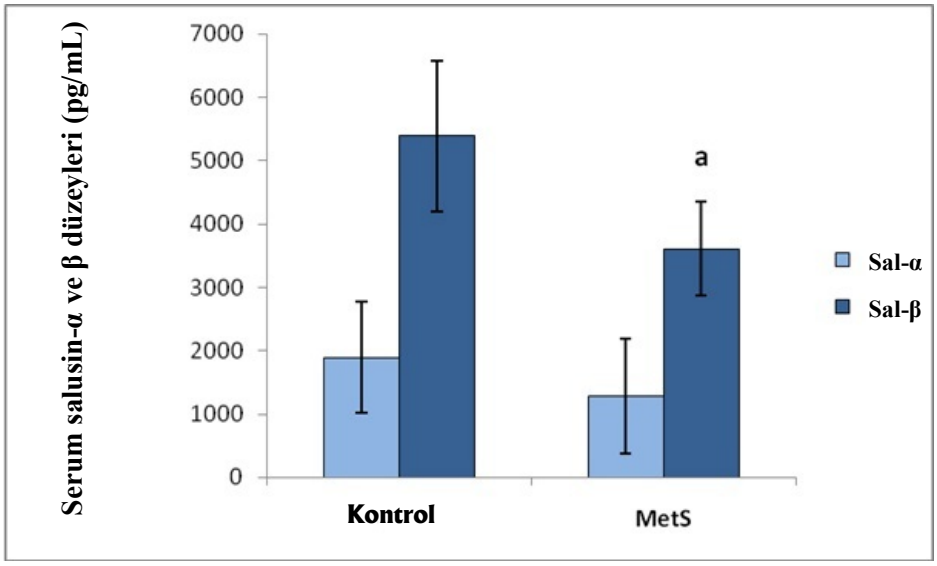
3.3.1. Salusin-α ve Salusin-β Düzeyleri

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MetS grubunda hem serumda, hem de beyin ve karaciğer dokularında Sal-α ve Sal-β düzeylerinin azaldığı belirlendi. Serum ve beyindeki Sal-α azalışlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeye erişemediği ($p > 0.05$), karaciğerde ise Sal-α düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı ($p < 0.05$) saptandı. MetS grubunda serum ve karaciğer dokularında Sal-β düzeylerindeki azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$), beyin dokusunda Sal-β düzeylerindeki azalışlarının ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı ($p > 0.05$) belirlendi. Serum, beyin ve karaciğer dokulardaki Sal-α ve Sal-β düzeylerindeki değişimler grafik halinde sunulmuştur (Şekil 3.3 – Şekil 3.7). Beyin ve karaciğer dokularındaki Sal-α ve Sal-β ekspresyonlarının MetS'e bağlı değişim oranları hesaplanarak tablo halinde sunuldu (Tablo 3.5).

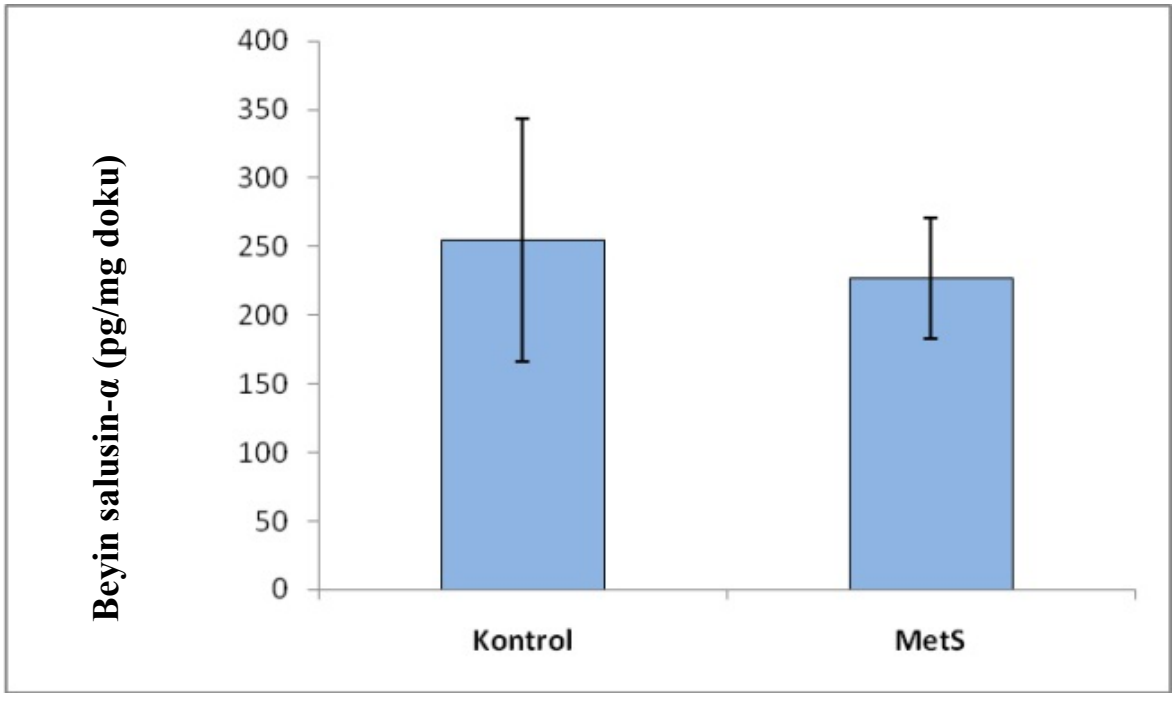
Tablo 3.5. Metabolik sendromda salusin-α ve salusin-β ekspresyonlarının değişim oranları

Parametre	Doku hormon değişim oranları (%)	
	Beyin	Karaciğer
Sal-α	– 10.98	– 26.13 [a]
Sal-β	– 24.60	– 22.85 [a]

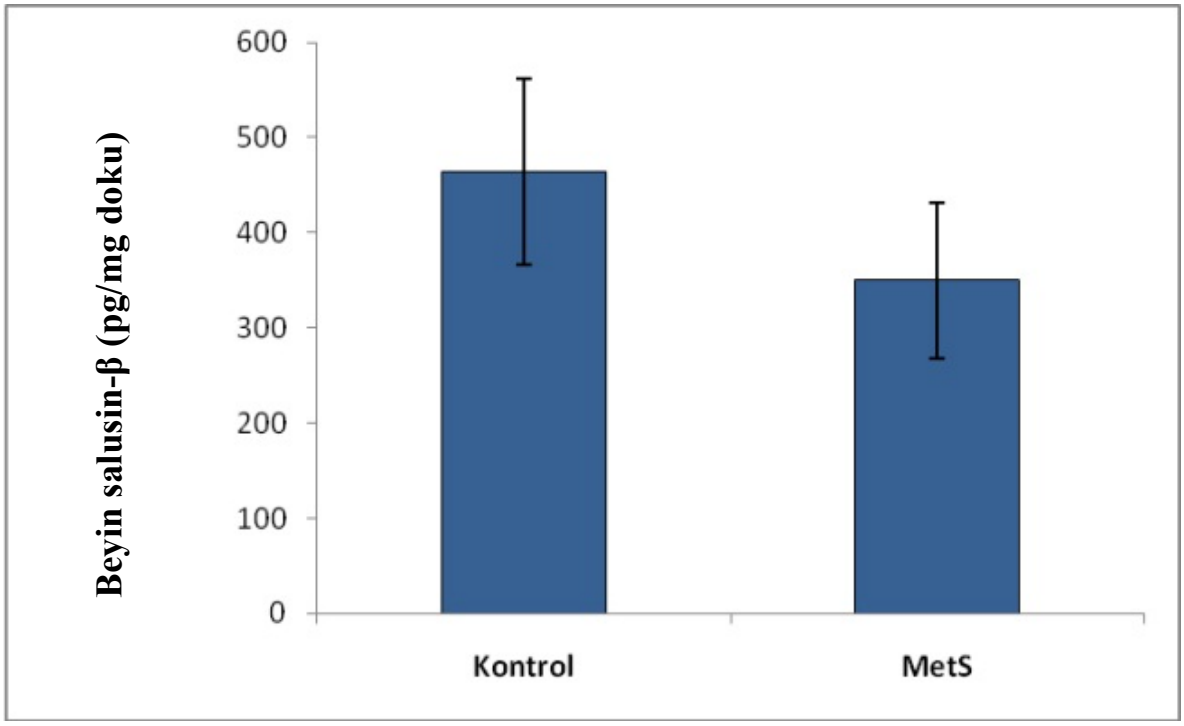
Sal-α: Salusin-α. Sal-β: Salusin-β. –: Azalış. a: $p < 0.05$.



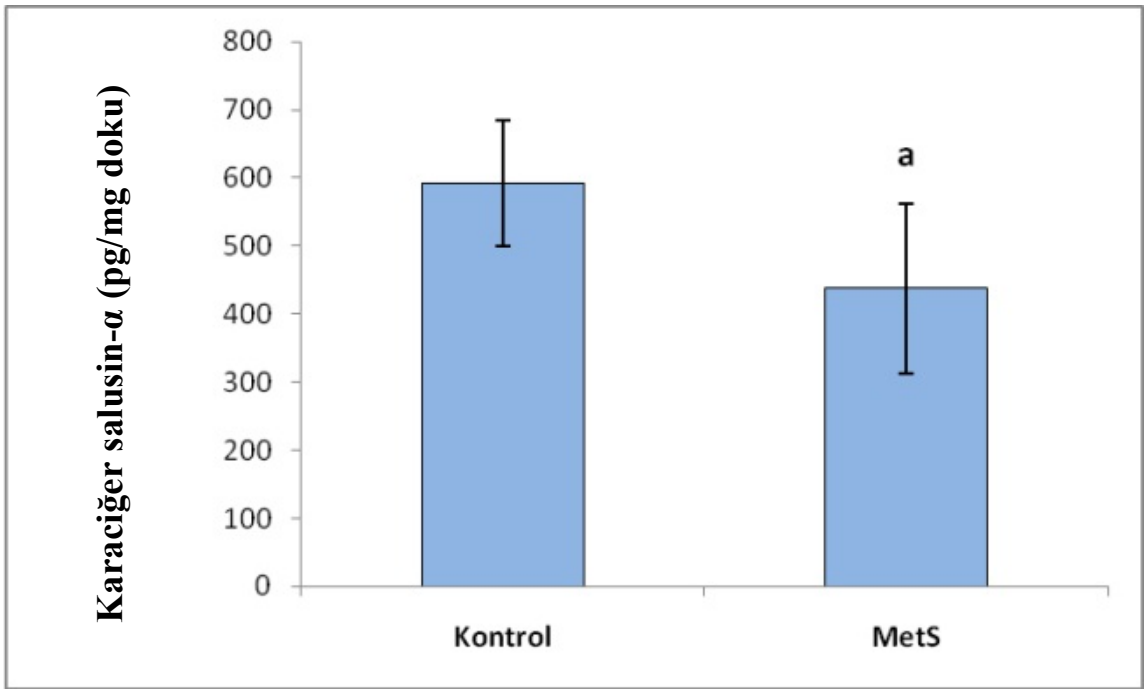
Şekil 3.3. Serum salusin-α ve -β değişimleri
MetS: Metabolik sendrom. Sal-α: Salusin-α.
Sal-β: Salusin-β. a: $p < 0.05$.



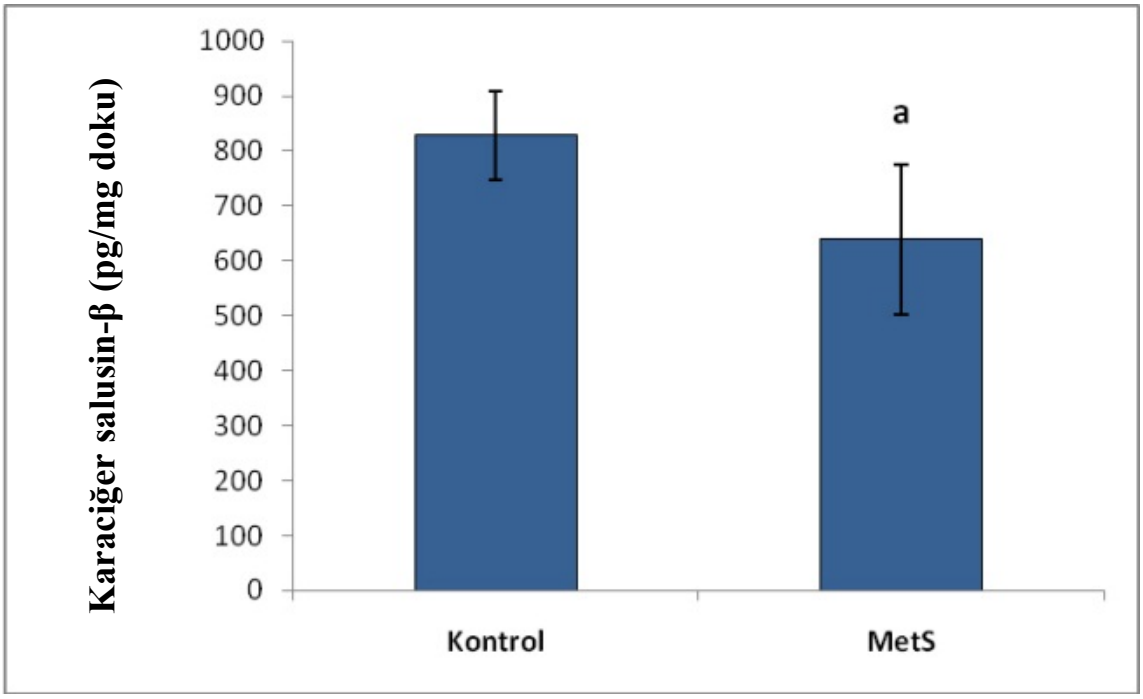
Şekil 3.4. Beyin salusin-α değişimleri
MetS: Metabolik sendrom.



Şekil 3.5. Beyin salusin-β değişimleri
MetS: Metabolik sendrom.



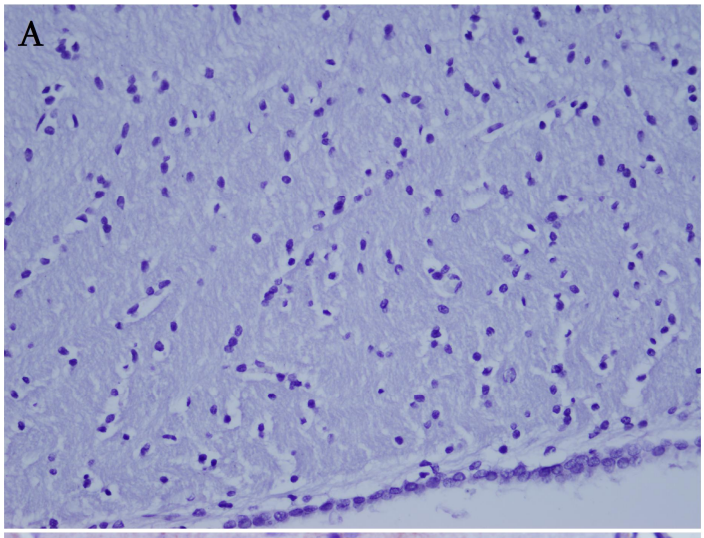
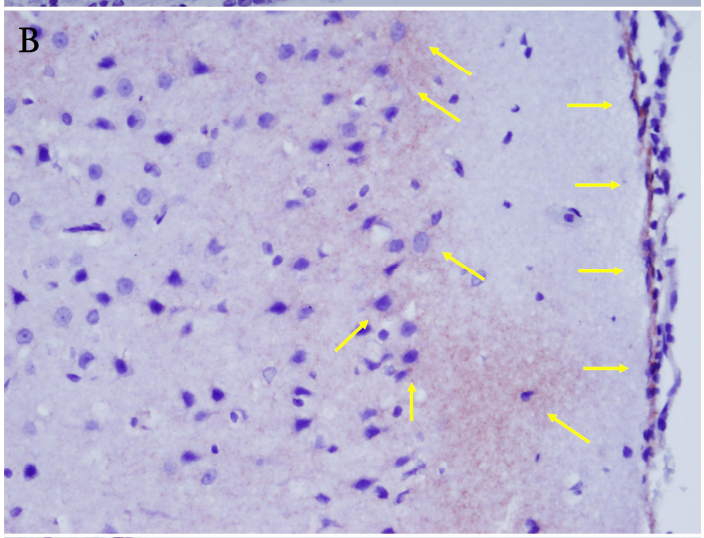
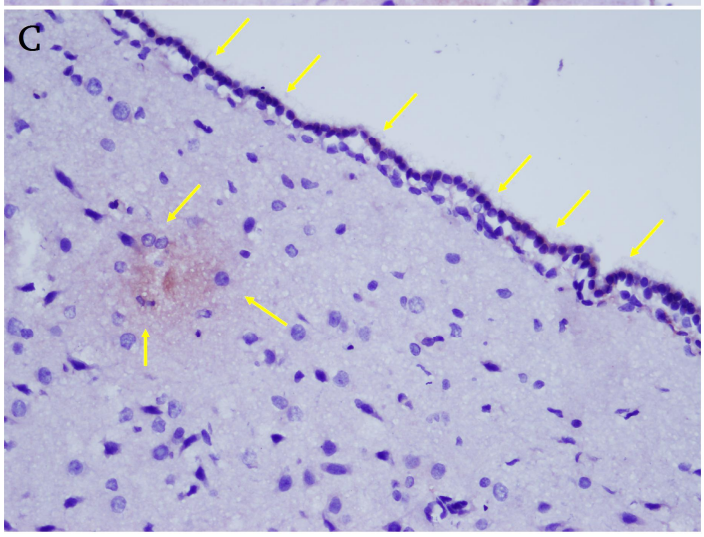
Şekil 3.6. Karaciğer salusin-α değişimleri
MetS: Metabolik sendrom. a: $p < 0.05$.



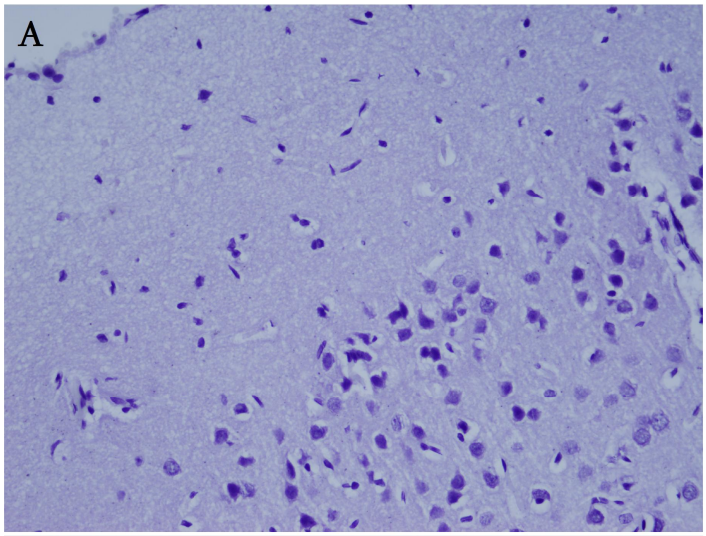
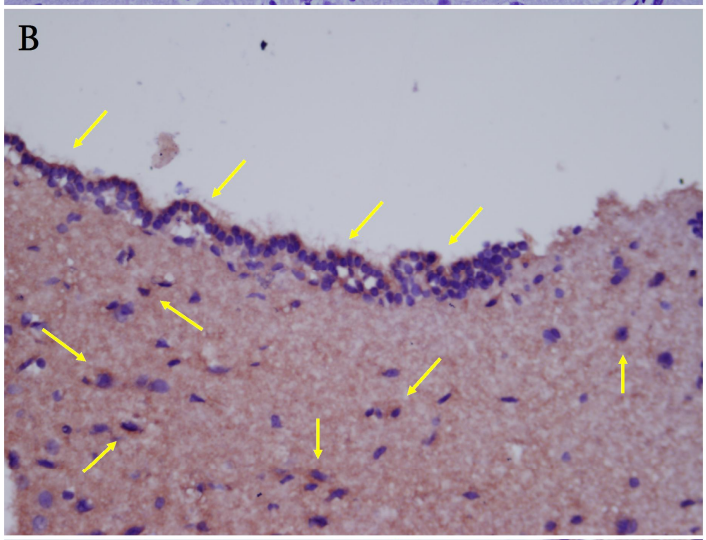
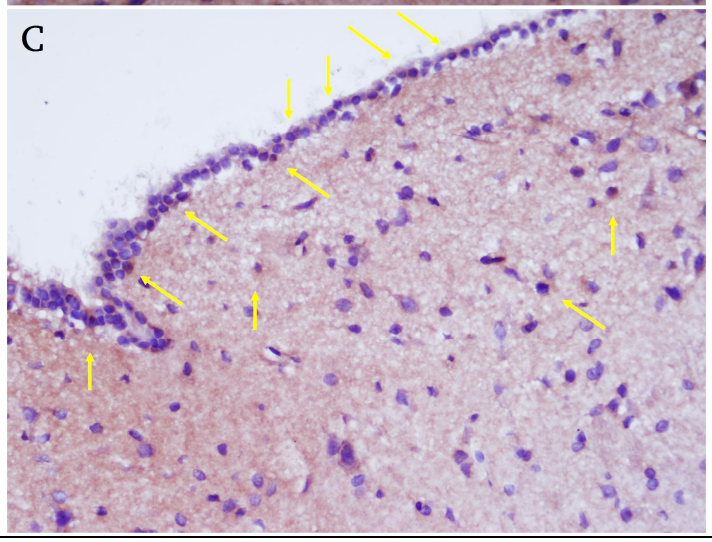
Şekil 3.7. Karaciğer salusin-β değişimleri
MetS: Metabolik sendrom. a: $p < 0.05$.

Hem kontrol hem de MetS gruplarının immünohistokimyasal analizlerinde; beyin ve karaciğer dokularında bütün hücre nükleuslarının *Mayers hematoksilen* (kontrast boyama) ile mavi renge boyandığı saptandı. İmmünopozitif hücrelerde Sal-α ve Sal-β ekspresyonlarının hücre sitoplazmasında lokalize olduğu, dokuları kuşatan epitel hücrelerinde apikal kısımlarda yoğunlaştığı tespit edildi. Hormon ekspresyon oranlarına bağlı olarak immünopozitif hücrelerin spesifik bölümlerinin kırmızının çeşitli tonlarına boyandığı belirlendi. Kontrol ve MetS grubu sıçanların beyin ve karaciğer dokularında immünohistokimyasal yöntemle saptanan Sal-α ve Sal-β ekspresyonlarını gösteren doku fotoğrafları ve immünoreaktivite dağılımları şekil ve tablo halinde sunuldu (Şekil 3.8 – Şekil 3.11, Tablo 3.6).

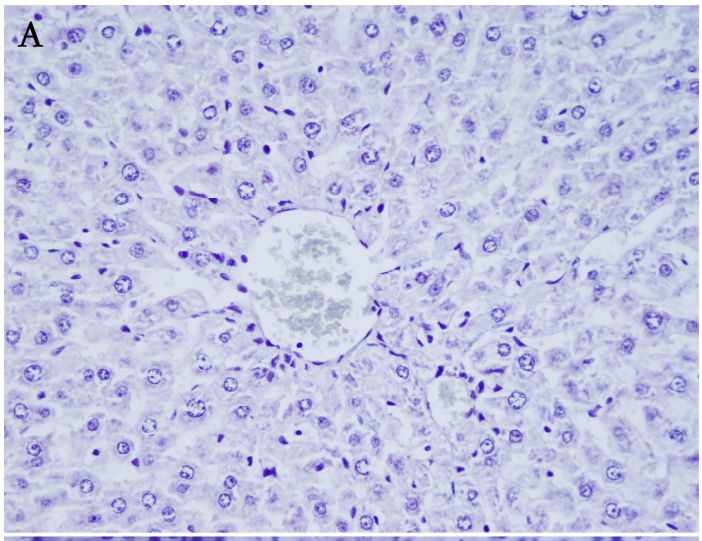
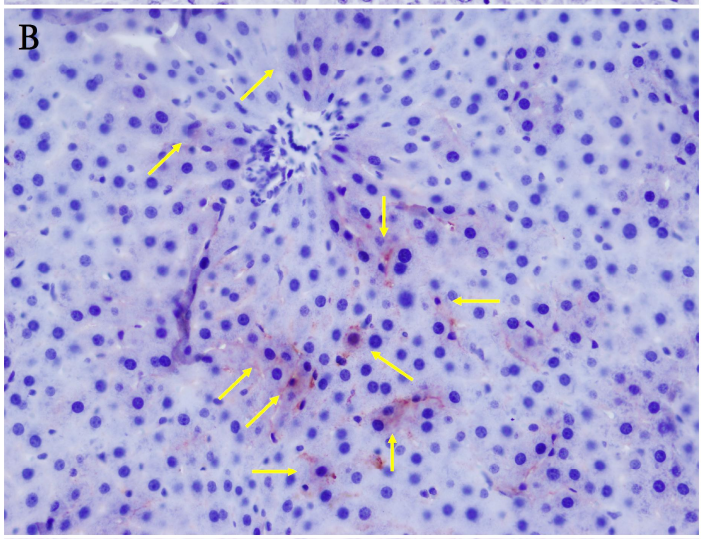
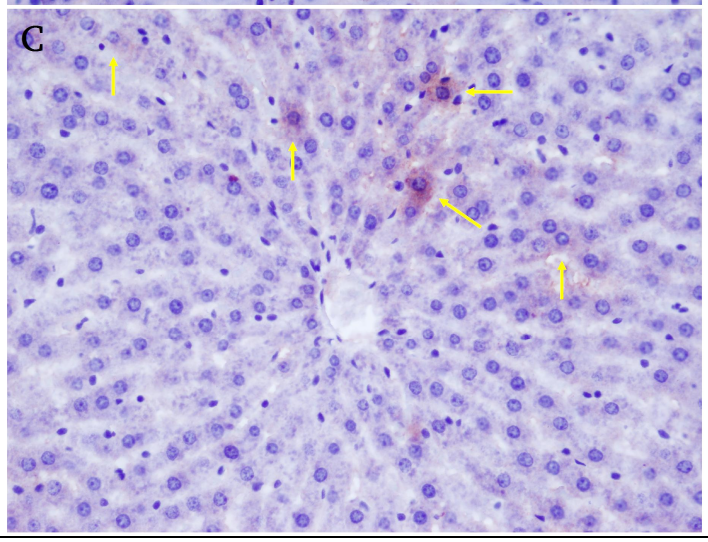
İmmünohistokimyasal boyanma yoğunluk farklarına göre dokular istatistiksel olarak değerlendirildi. Beyin ve karaciğer dokularındaki Sal-α ekspresyonlarının İHK boyanmaları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; boyanma yoğunluklarının kontrol grubunda; beyin ve karaciğerde immünohistokimyasal olarak kuvvetli pozitivite gösterdiği, MetS grubunda bu pozitivitenin azaldığı belirlendi. Sal-β ekspresyonlarının İHK boyanmaları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol grubunda; beyin ve karaciğerde boyanma yoğunluklarının pozitivite gösterdiği, MetS grubunda bu pozitivitenin azaldığı saptandı (Tablo 3.7).

A Beyin Negatif İHK Sal-α	
B Beyin Kontrol İHK Sal-α	
C Beyin MetS İHK Sal-α	

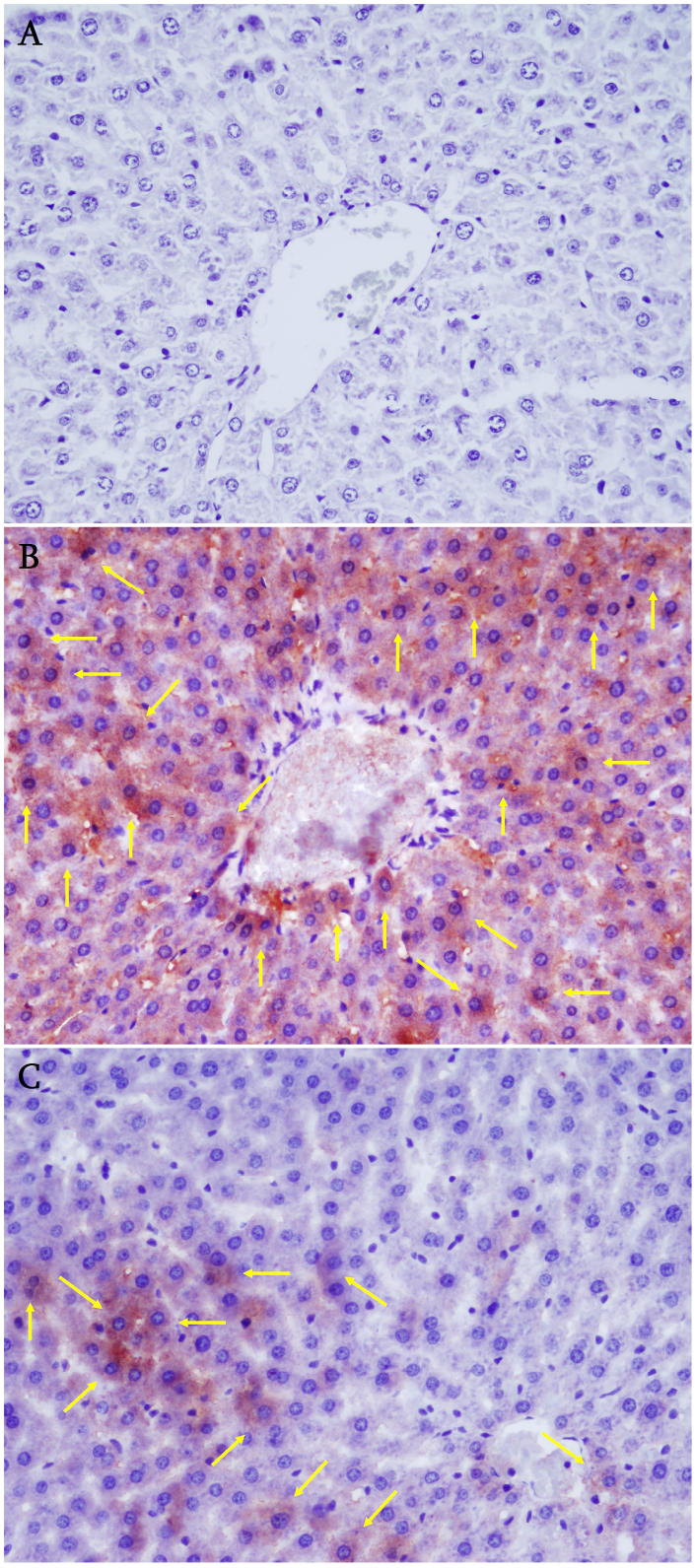
Şekil 3.8. Beyin salusin-α ekspresyonlarının immünohistokimyası
İHK: İmmünohistokimya. MetS: Metabolik sendrom. Sal-α: Salusin-α. Büyütme x 400.

A Beyin Negatif İHK Sal-β	
B Beyin Kontrol İHK Sal-β	
C Beyin MetS İHK Sal-β	

Şekil 3.9. Beyin salusin-β ekspresyonlarının immünohistokimyası
İHK: İmmünohistokimya. MetS: Metabolik sendrom. Sal-β: Salusin-β. Büyütme x 400.

A Karaciğer Negatif İHK Sal-α	
B Karaciğer Kontrol İHK Sal-α	
C Karaciğer MetS İHK Sal-α	

Şekil 3.10. Karaciğer salusin-α ekspresyonlarının immünohistokimyası
İHK: İmmünohistokimya. MetS: Metabolik sendrom. Sal-α: Salusin-α. Büyütme x 400.

A Karaciğer Negatif İHK Sal-β	
B Karaciğer Kontrol İHK Sal-β	
C Karaciğer MetS İHK Sal-β	

Şekil 3.11. Karaciğer salusin-β ekspresyonlarının immünohistokimyası
İHK: İmmünohistokimya. MetS: Metabolik sendrom. Sal-β: Salusin-β. Büyütme x 400.

Tablo 3.6. Salusin-α ve salusin-β ekspresyonlarının dağılımı.

Parametre	Beyin	Karaciğer
Sal-α	Sinir dokuyu kuşatan epitel tabaka hücreleri ve hipotalamusun supraoptik nükleus hücreleri	Hepatosit hücreleri
Sal-β	Sinir dokuyu kuşatan epitel tabaka hücreleri ve hipotalamusun supraoptik nükleus hücreleri	Hepatosit hücreleri

Sal-α: Salusin-α. Sal-β: Salusin-β.

Tablo 3.7. Salusin-α ve salusin-β ekspresyonlarının immünohistokimyasal değerlendirmesi.

Parametre	Beyin		Karaciğer	
	Kontrol	MetS	Kontrol	MetS
Negatif	–		–	
Sal-α	+3	+1	+3	+2
Sal-β	+2	+1	+2	+1

MetS: Metabolik sendrom. Sal-α: Salusin-α. Sal-β: Salusin-β.+: pozitif immünohistokimyasal reaksiyon. – : negatif immünohistokimyasal reaksiyon.

3.4. İlişki Analizleri

Kontrol ve MetS grubu sıçanların; serum, beyin ve karaciğer dokularında çalışılan parametrelerde pek çok değişim saptandı. Pearson's testi kullanılarak tespit edilen bu ilişkiler çalışma grubu ve ilişki türlerine göre sınıflandırılarak ilişki tabloları halinde sunuldu (Tablo 3.8 – 3.9).

Tablo 3.8. Kontrol grubu ilişkileri

İlişki	r	*p*	İlişki	r	*p*
VKİ $_{8.\ hafta}$ – LDL-K	+0.815	0.048	VKİ $_{6.\ hafta}$ – Serum Sal-β	–0.830	0.041
VKİ $_{8.\ hafta}$ – VLDL-K	+0.932	0.007	VKİ $_{6.\ hafta}$ – VKİ $_{10.\ hafta}$	–0.873	0.023
VKİ $_{10.\ hafta}$ – HDL-K	+0.875	0.023	VKİ $_{10.\ hafta}$ – TG	–0.835	0.039
VKİ $_{12.\ hafta}$ – Karaciğer Sal-α	+0.850	0.032	ASİ – Karaciğer Sal-β	–0.964	0.036
VKİ $_{12.\ hafta}$ – Karaciğer Sal-β	+0.878	0.021	GGT – Serum Sal-β	–0.832	0.040
HDL-K – Karaciğer Sal-α	+0.843	0.035	HDL-K – TG	–0.935	0.006
Karaciğer Sal-α – Karaciğer Sal-β	+0.960	0.002	TG – ÜA	–0.905	0.035
LDL-K – VLDL-K	+0.830	0.041	–		
TK – Beyin Sal-β	+0.816	0.048			

ASİ: Açlık serum insülin. GGT: Gamma glutamiltransferaz. HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol. LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol. Sal-α: Salusin-α. Sal-β: Salusin -β. TG: Trigliserid. TK: Total kolesterol. ÜA: Ürik asit. VKİ: Vücut kitle indeksi. VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu kolesterol.

Tablo 3.9. Metabolik sendrom grubu ilişkileri

İlişki	r	*p*	İlişki	r	*p*
VKİ $_{Bazal}$ – VKİ $_{10.\ hafta}$	+0.846	0.034	VKİ $_{Bazal}$ – TG	–0.948	0.004
VKİ $_{2.\ hafta}$ – VKİ $_{12.\ hafta}$	+0.927	0.008	VKİ $_{2.\ hafta}$ – ASİ	–0.889	0.044
VKİ $_{6.\ hafta}$ – Beyin Sal-α	+0.861	0.027	VKİ $_{2.\ hafta}$ – GGT	–0.860	0.028
VKİ $_{8.\ hafta}$ – ASG	+0.880	0.021	VKİ $_{6.\ hafta}$ – TP	–0.826	0.043
VKİ $_{8.\ hafta}$ – VLDL-K	+0.860	0.028	VKİ $_{8.\ hafta}$ – HDL-K	–0.938	0.006
VKİ $_{8.\ hafta}$ – Karaciğer Sal-α	+0.856	0.030	VKİ $_{10.\ hafta}$ – TG	–0.858	0.029
VKİ $_{10.\ hafta}$ – TK	+0.898	0.015	VKİ $_{12.\ hafta}$ – ASİ	–0.987	0.002
VKİ $_{12.\ hafta}$ – Karaciğer Sal-β	+0.856	0.030	HDL-K – VLDL-K	–0.956	0.003
ASG – Karaciğer Sal-α	+0.885	0.019	LDL-K – Beyin Sal-β	–0.877	0.022
TK – Serum Sal-α	+0.895	0.016	–		

ASİ: Açlık serum insülin. ASG: Açlık serum glukoz. GGT: Gamma glutamiltransferaz. HDL-K: Yüksek yoğunluklu kolesterol. LDL-K: Düşük yoğunluklu kolesterol. Sal-α: Salusin-α. Sal-β: Salusin-β. TG: Trigliserid. TK: Total kolesterol. TP: Total protein. VKİ: Vücut kitle indeksi. VLDL-K: Çok düşük yoğunluklu kolesterol.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Metabolik sendrom (MetS) etiyolojisi tam olarak aydınlatılamadığı için dünya ve ülkemiz genelinde hızla yaygınlaşmakta ve semptomları arasında prediyabet, diyabet, abdominal obezite, kan yağı düzeyinde bozukluk ve yüksek kan basıncı gibi birçok faktörün bir arada bulunduğu önemli bir halk sağlığı sorunudur [1]. MetS canlıların tüm endokrinal sistemlerini etkilemekte ve böylece anormal fizyolojik ve biyokimyasal olaylar ortaya çıkmaktadır. Her ne kadar etiyolojisi tam olarak bilinmese de peptid yapılı hormonların etiyopatolojisinde yer aldığına dair bir çok çalışma mevcuttur [23].

Biz bu çalışmayı, yeni keşfedilmiş ve kan basıncının düzenlemesinde rolü olan salusinlerin MetS'e bağlı olarak hem dolaşımda hem de endokrinal sistemi kontrol altında tutan beyin dokusu ile birçok biyokimyasal olayın cereyan ettiği vücudun en önemli organlarından biri olan karaciğer dokusunda, ekspresyonlarının nasıl değiştiğini ortaya koymak için dizayn ettik.

Çalışmamızda özellikle bu iki dokuyu seçmemizin ana sebeplerinden biri bu dokuların fruktoz transportu açısından farklı oluşudur [57]. Deneyde oluşturulan MetS modelimizde fruktoz yaygın olarak kullanılmaktadır. Dolayısı ile bu tezde; MetS oluşturulduktan sonra fruktozun hücre içerisine alınmasında yardımcı GLUT5 taşıyıcısı olan (karaciğer) ve olmayan (beyin) iki dokunun MetS'e bağlı olarak histokimyasal anlamda nasıl bir değişiklik gösterdiği, ayrıca Sal-α ve Sal-β peptidlerinin ekspresyonlarına nasıl etki ettiği araştırıldı.

Bu çalışmada 35-40 günlük *Sprague-Dawley* türü sıçanlar kullanıldı. Üç ayın sonunda da MetS'in üç kriterine (artmış glukoz, azalmış HDL-K ve artmış VKİ) ulaşıldı. Çalışmada ATP III kriterlerinden; artmış glukoz, HDL-K ve VKİ'nin seçilmesinin temel sebebi bu üç parametrenin ölçüm kolaylığıdır. MetS'li sıçanlarda glukoz değeri 188.67 mg/dL bulunurken, kontrollerde ise 91.33 mg/dL olarak rapor edildi. ATP III kriterlerine göre glukoz değeri 110 mg/dL'nin üzerine çıktığında [26] öngörülen üç kriterden biri gerçekleşmektedir. Dolayısıyla MetS'li sıçanlarda rapor ettiğimiz 188.67 mg/dL değerine ulaşıldığından sıçanlarımız bu kriteri karşılamaktadır. Yine baz aldığımız HDL-K düzeyi ise MetS'li sıçanlarda 32.50 mg/dL ye düşmüş olup, ATP III kriterleri erkeklerde HDL-K düzeyinin 40mg/dL'nin altında olmasını öngörmektedir [26]. Dolayısıyla düşmüş HDL-K değeri MetS'in diğer kriterini de yerine getirmekteydi. HDL-K azalması literatürdeki MetS'li çalışmalarla uygunluk göstermektedir [91-100]. Ancak MetS'de HDL-K'nın

değişmediğine dair bazı çalışmalar da mevcuttur [101]. Yine bu çalışmada üçüncü kriterinde yerine getirilip getirilmediğini anlamak için sıçanların VKİ değerlerine bakıldı. VKİ değerleri kontrolde 0.72 g/cm^2 rapor edilirken, MetS'li sıçanlarda bu değer 1 g/cm^2'nin üzerinde kaydedildi. VKİ değeri sıçanlarda 0.72 g/cm^2 normal olarak kabul edilirken, Dr. Şahin'in yaptığı tez çalışmasında insan VKİ'leri baz alınarak sıçanlar için obezite kriteri olarak VKİ değerleri hesaplanmış olup, VKİ değerinin 1 g/cm^2 nin üzerine çıkmasının obez anlamına geldiğini ifade etmiştir [81,87]. Yukarıda belirtildiği gibi baz alınan ATP III kriterleri üç aylık deney sonucunda elde edilmiş ve böylece MetS oluştuğu kanaatine varılmıştır.

Çalışmada ek olarak ASG ve HDL-K'nın dışında kalan diğer biyokimyasal parametreler de araştırıldı. ALT değerinin, kontrolle kıyaslandığında % 26.63 arttığı gözlendi. Gözlenen ALT artışı daha önce yapılan MetS'li çalışmalarla uygunluk taşımaktadır [91,92,94-97,102-105]. ALT artışının normalin iki-üç katını geçmediği bildirilmiş olup [106] sıçanlarımızdaki ALT artışı da bu sınırın altında kaldı. ALT artışının bu sınırın altında kalmasının muhtemel sebebinin; MetS'li sıçanlarda VKİ değerinin artması olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü VKİ ve bel çevresindeki artışların aminotransferazları baskıladığı bildirilmiştir [107,108].

Karaciğer enzimlerinden AST değerlerinde çalışmamızda MetS'e bağlı olarak azalma olduğu rapor edilmiş olmasına rağmen, daha önce yapılan bir çok çalışmada AST'nin arttığı bildirilmiştir [91,92,94,102-105]. Çalışmamızda AST üreten hücrelerde MetS'e bağlı olarak oluşan hasarların AST düzeylerinin artışını baskıladığı kanaatindeyiz. Diğer yandan karaciğer enzimlerinden olan GGT düzeylerinin ise kontrole göre %12.97 arttığı bulundu. Bu gözlem önceden yapılmış bir çok literatür çalışması ile uyumluluk gösterirken [94-96,104,109], Donati ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile çelişmekteydi [105]. GGT'nin muhtemel artış sebebinin fruktoza bağlı olarak gelişen inflamasyondan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çünkü fruktozun inflamasyona neden olduğu bildirilmiştir [110-112].

Lipit profillerinden HDL-K dışındaki bütün parametrelerin [(LDL-K), (TG), (TK) ve (VLDL-K)] kontrolle kıyaslandığında MetS'e bağlı olarak arttığını gözlemledik. Gözlemlenen bu lipit profillerindeki artışlar daha önce rapor edilen MetS'li çalışmalarla (LDL-K [91,92,97,98,100,113], TG [91-100,101,103,105,113,114-117], TK [91,92,94,97-100,103,105,113,114,116-118] ve VLDL-K [91,92,98,100,117]) uygunluk göstermektedir. Lipit profilindeki bu artışların fruktoza bağlı olarak, yani fruktozun öncelikle fruktoz

1-fosfata [53] ve bunu takiben de aldolaz enzimlerini aktive ederek triozlara, triozların da yağ asidi sentezine, diğer bir deyişle triaçilgliserol oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir [54].

Çalışmamızda kontrolle kıyaslandığında MetS'li sıçanların protein düzeylerinin %11.23 arttığı bulundu. Geniş literatür taraması yapılmış olmasına rağmen protein düzeyinin arttığına dair sadece bir çalışmaya rastlayabildik [117]. Protein düzeyindeki artışın beslenmeye bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir. Malnutrisyonal (kötü beslenme) beslenmelerde protein düzeyi örneğin albümin düzeyi düşmektedir.

Çalışmamızda MetS'de ürik asit miktarlarını kontrol grubu ile kıyasladığımızda %45.58 arttığını saptadık. Ürik asitte gözlenen bu artış muhtemelen fruktozdan kaynaklanmaktadır. Çünkü gerek insanlarda [50] ve gerekse kemirgenlerde [51] fruktozun ürik asidin artışına neden olduğu bildirilmiştir [49]. Ürik asit artışı hiperinsülinemi, hipertrigliseridemi, hipertansiyon ve insülin direncine neden olmaktadır [52]. Amerikalı yetişkinlerde yapılan bir çalışmada; şeker tüketimi ile ürik asit konsantrasyonları arasında bir ilişki tespit edilmiştir. National Health ve Ulusal Sağlık Beslenme Taraması (Nutrition Examination Survey) uzmanlarının yaptığı çalışmada; meşrubat tüketenlerde ürik asit konsantrasyonları ile sistolik kan basıncı arasında doğru orantı olduğu bildirilmiştir [119].

Bu çalışmada; MetS'li sıçanların insülin miktarının %432 arttığı bulunmuştur. Gözlemlenen ASİ değerinin yükselmesi önceden yapılmış MetS'li çalışmalarla paralellik göstermektedir [91,92,95,100,105,114,116-118,120]. İnsülin miktarındaki artışın MetS'de gözlemlenen obeziteden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çünkü obezite ile birlikte insülin direncinin de arttığı bildirilmiştir [121]. Artan insülin direncine bağlı olarak insülin dolaşımda birikmekte yani dokular tarafından kullanılamamaktadır. Dokular tarafından kullanılamayan insülin, glukozun hücre içine alınımını engellemekte ve buna bağlı olarak glukoz düzeyi kanda artmaktadır [26,30,122,123]. Ayrıca bilindiği gibi hiperglisemi, serin kinaz kaskatlarını aktive etmektedir [124]. Bu kinazlar (tirozin kinaz aktivitesi olan) insülin reseptör substrat (İRS) ile proteinlerinin fosforilasyonuna yol açmaktadır. İRS-1 ve İRS-2 serin fosforilasyonunda artmaya, tirozin fosforilasyonunda ise düşmeye yol açmaktadır [121]. Sonuç olarak fosfotidilinositol-3 (İP3) gibi sinyal moleküllerinde aktivite azalması insülin etkisinin azalmasına, insülin etkisinin azalması da insülin direncinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır [121].

Daha önce bahsedildiği gibi peptid yapılı hormonlar MetS'in etiyopatolojisinde rol oynamaktadırlar. MetS kriterlerinden biri hipertansiyon olup, biz bu çalışmada; kuvvetli

hipotansiyon ve bradikardiye sebep olan Sal-α ve Sal-β peptitlerinin ekspresyonlarının MetS'e bağlı olarak nasıl değiştiğini de araştırdık. Ölçümleri yapmadan önce kullanılan kitlerin gerek dokular ve gerekse serumlar için ASSAY geçerlilik deneyini yaptık. Kitlerin serum ve dokulardaki ölçüm karakteristikleri Tablo 3.3. ve 3.4'de verilmiştir. Buna göre kitin ölçüm aralığı Sal-α için 2-400 pg/mL olarak belirtilirken, Sal-β için ölçüm aralığı 0.10-500 pg/mL olarak bulunmuştur. Bu durum serumda 2 pg/mL düzeyinde Sal-α ve 0.10 pg/mL Sal-β olması durumunda bile kullanılan kitlerin ölçüm yapabileceğini göstermektedir. İntra-Assay ve İnter-Assay sonuçları da kabul edilebilir co-efficient varyasyon (standart sapmanın ortalamaya bölünmesiyle elde edilir) %'sine sahiptir. Genel olarak co-efficient varyasyon %'si, %10'un altında kabul edilmiş olmasına rağmen, %15'e kadar değişimlerde kabul edilebilir aralıktadır [88]. Ayrıca Assay optimal bir linearite (Numuneleri belli aralıklarla dilüsyon yaparak doğrusallık elde edilip edilmediği testidir.) ve geri kazanım (Bilinen miktarlarda Sal-α konsantrasyonları eklenmiş ve eklenen bu değerin ne kadarının tekrar elde edilebildiği anlamındadır.) göstermiştir. Benzer şekilde serum kitleri doku süpernatantlarında da kullanılmış olup, ASSAY geçerlilik deneyi ile süpernatantlarda ölçüp ölçmediği test edilmiştir. Serum numunelerinde olduğu gibi doku süpernatantlarında da Sal-α ve Sal-β'nin ölçüldüğü rapor edildi.

Çalışmamızda MetS oluşturulmuş sıçanların serumlarında Sal-α düzeyi kontrol grubu ile kıyaslandığında bir azalma tespit edildi fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Azalan Sal-α düzeyinin aterosklerotik lezyonların artmasına neden olduğu rapor edilmiştir [75]. Aterosklerotik lezyonların artması, damarların tıkanması anlamına gelmektedir. Zaten MetS'de gözlenen hipertansiyon Sal-α seviyesinin azalmasıyla karakterizedir [74]. Bulgularımızı destekleyen en önemli veri sağlıklı bireylerde serum Sal-α düzeylerinin değişmediği yönündeki raporlardır [125]. Ayrıca eğer Sal-α düzeyleri azalmamış olsaydı makrofaj köpük hücre formasyonu oluşumu baskılanacak ve bu da aterosklerotik plakların oluşumunu engelleyecekti [77].

Bu çalışmada Sal-β düzeylerine de bakılmış olup, kontrol değerleriyle kıyaslandığında MetS'li sıçanların dolaşımdaki Sal-β düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği bulundu. Azalan gerek Sal-α ve gerekse Sal-β düzeyi apoptosisi engelleyememekte dolayısıyla MetS ile birlikte dokuların apoptosise yönelmesinin bir sonucu olarak [77], yaşlanmayı artıracağını düşünmekteyiz. Çalışmamızda azalan Sal-β düzeyi aterosklerotik lezyonların azalmasına yardımcı olacağı [77] ve bu yüzden de MetS'e bağlı yükü azaltmak amacıyla Sal-β'nin seviyesinin

azaldığını düşünmekteyiz. MetS'e bağlı olarak hipertrofik etki ortaya çıkmaktadır. Bu durum kardiyomiyosit dokularında da gözlenmektedir [77]. Dokuların hipertrofik etkilerini ortadan kaldırmak maksadıyla salusin seviyelerinin azalma gösterdiğini düşünmekteyiz. Öte yandan; dolaşımda düşen Sal-β seviyesi hipertansiyonu tetiklemektedir. Çünkü; Sal-β indirekt vazodilatatör bir peptid olup hipotansiyona yol açmaktadır. Salusinlerin vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlar üzerinde mitojenik etkileri ve hemodinamik homeostasiste rolleri bulunmakta olup, salusinlerdeki azalmanın koroner aterosklerozisten kaynaklanabileceği de düşünülmektedir. Bu fonksiyon, aterosklerozisin önemli bir karakteristiği olarak öngörülmektedir [74,126]. Sal-β ile aynı etkileri gösteren Sal-α sıçanlardaki Sal-β'ye göre daha az potent olarak bulunmuştur [69].

Anjiyografik olarak koroner arter darlığı ve orta derecede hipertansiyonu olan hastaların serum Sal-α seviyelerinin kontrol grubuna göre azaldığı bildirilmiştir. Hipertansif hastalarda serum Sal-α (anti-atherogenic peptid) seviyelerindeki azalmanın karotik aterosklerozis ile ilişkili olabileceği de ileri sürülmüştür [74]. Sal-α düzeyleri akut koroner sendromda azalmıştır. Hatta üç damar hastalığı olan olgularda, tek damar hastalığı olan olgulara göre Sal-α düzeylerinin daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Serum Sal-α düzeyleri aynı zamanda orta dereceli hipertansif hastalara kıyasla iskemik kalp hastalıklı olgularda daha düşük olarak tespit edilmiştir [74]. Ayrıca serum Sal-α düzeyleri aterosklerotik kalp hastalığının ciddiyeti ile de doğru orantılı olarak düşük seviyede tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında serum Sal-α düzeylerinin aterosklerozis gelişiminde önleyici faktör olabileceği ileri sürülmüştür [75].

Çalışmamızda serum Sal-α ve Sal-β değerleri konsantrasyon bakımından birbiri ile karşılaştırıldığında gerek normal ve gerekse MetS'li sıçanların Sal-β düzeyleri Sal-α düzeylerinden 2-2.5 kat daha yüksek bulunmuştur. Daha önceki yapılan çalışmalarda da Sal-β'nin Sal-α'dan daha yüksek olduğu bildirilmiştir [125]. İnsanlarla yapılan çalışmalarda da Sal-β düzeyinin 5-6 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir [71]. Yapılan çalışmalarda sal-β, sal-α'dan daha düşük bulunursa bu durum muhtemelen preklinik hatadan kaynaklanmaktadır. Çünkü Sal-β polipropilen ve polistren tüplerinin kenarına yapıştığından tüplere "NP-40 (Nonidet P-40)" veya "Tween-20" koyulmadığı manasına gelmektedir [70].

Glukoz, hücre içine sodyum simportu ya da kolaylaştırılmış difüzyonla [glukoz transporturlarıyla (GLUT1, GLUT2 GLUT3, GLUT4 GLUT5, GLUT6, GLUT7) alınmaktadır [53,57]. Glukoz taşıyıcıları arasında sadece *Glucose Transporter 5* (GLUT5)

aynı zamanda fruktozun hücre içerisine alınmasında da rol oynamaktadır [57]. Bilindiği gibi GLUT5 karaciğer dokusunda fruktozun hücre içine alınmasında rol oynamasına rağmen, beyin dokularında GLUT5 taşıyıcısı bulunmadığından, beyinde fruktoz GLUT5 aracılığı ile hücre içerisine alınamamakta dolayısıyla beyinde doygunluk merkezi inhibisyonunun oluşmasıyla MetS grubundaki sıçanlar kontrol grubuna kıyasla daha fazla yem tüketerek obez olmaktadırlar. Ancak, bu çalışmada beyin ve karaciğer dokularında Sal-α ve Sal-β sentezleri bakımından önemli bir fark tespit edemedik. Bu durumun olası nedeni olarak, MetS'in etkisiyle GLUT5 aktivitesinde bir azalmanın meydana geldiğini tahmin etmekteyiz. Çünkü Litherland ve ark. yaptığı çalışmada da MetS'e bağlı olarak GLUT5 seviyesinde azalmanın oluştuğu bildirilmiştir [57,127].

Yukarıdaki hipotezimizi test etmek maksadıyla beyin dokusunda Sal-α ve Sal-β'nin ekspresyonlarının MetS ile nasıl değiştiğini gerek immünohistokimyasal (İHK) olarak ve gerekse de beyin dokusunu homojenize ederek inceledik. Beyin dokusu homojenize edildikten sonra süpernatantlarında Sal-α ekspresyonlarına *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) yöntemiyle bakıldı. MetS'li sıçanların beyin dokusu Sal-α ekspresyonları kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamsız bir azalma (yaklaşık %11) tespit edildi. Sal-α ekspresyonları daha önce aterosklerotik plaklar, adrenal medulla, böbrekler, endotelyal hücreler, fibroblastlar, timus, kan damarları, kemik iliği, makrofajlar, vasküler düz kas hücreleri [77], göbek kordonu [128], hipofiz ve hipotalamusda [77] bulunduğu rapor edilmiş olup, bu çalışmada da beyin dokusunun Sal-α'yı sentezlediği ve MetS'le seviyesinin düştüğünü rapor ettik. Bu Sal-α'nın birçok dokuda sentezlenmekte olduğunu ve sentezinin yapıldığı herhangi bir dokunun herhangi bir nedenle örneğin burada olduğu gibi MetS nedeniyle Sal-α sentez hücrelerinin sentezlerini azaltmalarının dolaşımdaki serum Sal-α düzeylerine de yansıdığını göstermektedir. Bu durum daha önce tartıştığımız düşen serum Sal-α düzeyleri ile uyumluluk göstermektedir.

Daha öncede insan aortu, *Left İnternal Mammary Artery* (LİMA) ve safen ekstraklarında benzer yöntemle Sal-α düzeyleri çalışılmış olup, aortun Sal-α'yı yaklaşık olarak 200 pg/mg doku olarak sentezlediği rapor edilirken, LİMA'nın 125 pg/mg ve safen'in ise 260 pg/mg doku olarak rapor edilmiştir [71]. Aort, LİMA ve safen'de ki Sal-α değerlerini MetS'li beyin dokusundaki Sal-α değerleri ile kıyasladığımızda; Sal-α, aort ve LİMA'da beyin dokusuna göre düşük çıkarken, safen de ise beyin dokusundan daha

yüksek olduğu görülmektedir. Dolayısıyla MetS'li beyin dokusunun aort ve LİMA'dan daha fazla, safen'den ise daha az Sal-α sentezlediği görülmektedir.

Beyin dokusunun Sal-β değerlerini pg/mg doku olarak incelediğimizde kontrolde yaklaşık 460 pg/mg, MetS'li sıçanların dokusunda ise 350 pg/mg düzeyinde rapor edildi. Dolayısıyla MetS'li grupta Sal-β'nin yaklaşık %24 oranında, istatistiksel olarak anlamsız bir azalma tespit edildi. Sal-α'da olduğu gibi Sal-β ekspresyonlarının da daha önce aterosklerotik plaklar, adrenal medulla, böbrekler, endotelyal hücreler, fibroblastlar, timus, kan damarları, kemik iliği, makrofajlar, vasküler düz kas hücreleri [77], göbek kordonu [128], hipofiz ve hipotalamusta [77] bulunduğu bildirilmiş olup, aynı zamanda biz de bu çalışmada yukarıda belirtilen sentez yerlerine ek olarak çalışmamızda beyin dokusunun da Sal-β'yi sentezlediğini ELISA yöntemiyle gösterdik. MetS nedeniyle Sal-β'yi sentezleyen hücrelerin sentezlerinde azalmaya bağlı olarak dolaşımdaki serum Sal-β düzeyleri de azalmaktadır. Buna göre MetS'li beyin dokusunda azalan Sal-β'nin, önceden tartıştığımız serum Sal-β seviyelerindeki azalma ile paralellik gösterdiği tespit edildi.

Dr. Aydın'ın yaptığı tez çalışmasında insan aortu, LİMA ve safen ekstraklarında benzer yöntemle Sal-β düzeyleri çalışılmış olup, aort, LİMA ve safen'in Sal-β'yi yaklaşık olarak 150 pg/mg doku olarak sentezlediği rapor edilmiştir [71]. Aort, LİMA ve safen'deki Sal-β değerlerini MetS'li beyin dokusundaki Sal-β değerleri ile kıyasladığımızda; her üçünde de yaklaşık 2.3 kat daha düşük oranda tespit edildi. Dolayısıyla MetS'li beyin dokusunun aort, safen ve LİMA'dan daha fazla Sal-β sentezlediği rapor edildi.

Sal-α ve Sal-β'nin aort, LİMA, safen ve beyin dokusunun haricinde daha önceden süpernatantlarında herhangi bir çalışma bulunmadığından sonuçlarımızı başka bir çalışma ile kıyaslayamıyoruz. Gelecekte, yukarıda belirtilen yöntemle veya sistem dokularının mRNA ekspresyonlarına bakılarak gerek protein ve gerekse de mRNA seviyesinde hangi sistem dokusunun bu peptitleri daha fazla sentezlediğinin ortaya çıkarılmasının bilime katkı yapacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda fruktozun GLUT5 ile taşındığı organ olan karaciğer dokusunda da Sal-α'nın miktarı mg/doku olarak süpernatantlarda analiz edildi. Kontrol ile MetS'li grupta Sal-α'nın karaciğerdeki miktarı kıyaslandığında MetS'li sıçanlarda %26 istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu gözlendi. Karaciğer dokusunun kontroldeki Sal-α düzeyleri beyin dokusunun kontrolü ile kıyaslandığında karaciğer dokusunun Sal-α'yı 2-3 kat daha fazla sentezlediği rapor edildi. MetS'li karaciğer dokusunun Sal-α düzeyi ile MetS'li beyin dokusunun Sal-α düzeyi karşılaştırıldığında, MetS'li karaciğer dokusunun yaklaşık iki kat

daha fazla Sal-α'yı sentezlediği görülmektedir. Dolayısıyla gerek kontrol ve gerekse MetS'li karaciğer dokularında Sal-α, beyin dokularından daha fazla üretilmektedir. Bu da demektir ki karaciğer Sal-α'nın ana sentez yerlerinden birisidir. Ayrıca daha önce fibroblastlar, aterosklerotik plaklar, adrenal medulla, böbrekler, timus, kan damarları, kemik iliği, endotelyal hücreler, makrofajlar, vasküler düz kas hücreleri [77], göbek kordonu [128], aort, LİMA, safen, [71] hipofiz ve hipotalamusta [77] Sal-α'nın sentezlendiği bulunmuş olup, bu çalışmayla da karaciğer dokusunun Sal-α'yı sentezlediği ve karaciğerde MetS ile oluşan inflamasyona bağlı olarak Sal-α sentezinin azaldığı rapor edildi.

Bu çalışmada karaciğer dokusunda Sal-β'nin miktarı da mg/doku olarak süpernatantlarda analiz edildi. Kontrol ile MetS'li grupta Sal-β'nin karaciğerdeki miktarı kıyaslandığında MetS'li sıçanlarda yaklaşık %23 istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu gözlendi. Karaciğer dokusunun kontroldeki Sal-β düzeyleri beyin dokusunun kontrolü ile kıyaslandığında karaciğer dokusunun Sal-β'yi yaklaşık 1.5 kat daha fazla sentezlediği tespit edildi. MetS'li karaciğer dokusunun Sal-β düzeyi ile MetS'li beyin dokusunun Sal-β düzeyi karşılaştırıldığında, MetS'li karaciğer dokusunun MetS'li beyin dokusundan yaklaşık olarak 1.5 kat daha fazla Sal-β'yi sentezlediği görülmektedir. Dolayısıyla gerek kontrol ve gerekse MetS'li karaciğer dokularında üretilen Sal-β'nin, beyin dokularındaki Sal-β'den daha fazla olduğu ve karaciğer dokusunun Sal-β'nin ana sentez yerlerinden birisi olduğu rapor edildi. Ayrıca daha önce fibroblastlar, aterosklerotik plaklar, adrenal medulla, böbrekler, timus, kan damarları, kemik iliği, endotelyal hücreler, makrofajlar, vasküler düz kas hücreleri [77], göbek kordonu [128], aort, LİMA, safen [71], hipofiz ve hipotalamusta [77] Sal-β'nin sentezlendiği bulunmuş olup, bu çalışmayla da karaciğer dokusunun Sal-β'yi sentezlediği ve sentezinin de karaciğerde MetS ile oluşan inflamasyona bağlı olarak azaldığı tespit edildi.

Bu çalışmada MetS'e bağlı olarak beyin dokusunda Sal-α'nın nasıl değiştiğini İHK olarak inceledik. MetS'li beyin dokusunda Sal-α'nın %11 oranında azaldığı rapor edildi. Bu azalma dolaşımdaki miktarına da yansımış olup, serum değerlerindeki azalma ile paralellik göstermektedir. Beyin dokusunda Sal-α ekspresyonunun epitel hücre tabakaları tarafından yapıldığı tespit edildi. Beynin epitel tabaka hücrelerinin ghrelin [87] ve bir çok peptid yapıdaki hormonu sentezlediği rapor edilmiştir [129,130]. Lokal olarak sentezlenen bu peptidler biyolojik karakteristiklerine uygun olarak örneğin; doku yenilenmesi ve

salusinlerde olduğu gibi apoptosisin önlenmesi [125] gibi birçok fonksiyonu yerine getirdiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda beyin dokusunda MetS'e bağlı olarak Sal-β ekspresyonlarının değişimini de inceledik. Bu değişimde kontrol ile kıyaslandığında %24 azalma tespit edilmiş olup, MetS ile Sal-α'dan daha fazla baskılandığı, aynı zamanda dolaşımdaki Sal-β seviyelerinin, Sal-α'ya kıyasla daha fazla etkilendiği rapor edildi. Yine Sal-β, Sal-α'da olduğu gibi beynin epitel hücre tabakası tarafından sentezlenmekte, diğer bir deyişle beynin epitel hücrelerinde co-lokalize olarak bulunduğu tespit edildi. Bu da beynin epitel tabaka hücrelerinin nöroendokrinal olarak görev yaptığını göstermektedir. Ayrıca diğer bir çok peptid yapılı hormonun da bu tabaka tarafından sentezlediğine dair bir çok çalışma rapor edilmiştir [129,130].

Çalışmamızda MetS'e bağlı olarak Sal-α'nın karaciğer dokusunda nerede lokalize olduğunu İHK olarak araştırdık. Çalışmada Sal-α'nın ağırlıklı olarak karaciğerin hepatosit çok az miktarda da Kupffer hücreleri tarafından üretildiği İHK olarak tespit edildi. Aynı zamanda karaciğerin gerek Kupffer ve gerekse de hepatoselüler hücreleri tarafından çok sayıda peptid yapılı hormonun sentezlendiği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir [131].

Bu çalışmada MetS grubundaki sıçanların karaciğer dokularındaki Sal-α sentezlerinin %26 civarında azalmasının karaciğer dokusunda apoptosisi tetiklediğini düşündürmektedir. Çünkü Sal-α'nın apoptosisi azalttığı bilinmektedir. Ayrıca açil CoA-kolesterol açil transferaz-1 (ACAT1) miktarını ise artırmaktadır. Çünkü fizyolojik sınırlarda bulunan Sal-α, ACAT1 seviyesini düşürmektedir [77].

Çalışmamızda MetS'e bağlı olarak Sal-β'nin karaciğer dokusunun hangi hücreleri tarafından sentezlendiği de araştırıldı. Sal-β'de, Sal-α gibi karaciğerin hepatoselüler ve Kupffer hücreleri tarafından üretildiği rapor edildi. Çalışmada elde ettiğimiz bulgulara göre MetS'e bağlı olarak karaciğer dokusunda Sal-β'nin sentezinin %23 civarında azalması dolaşıma da yansıdığından Sal-β'nin üstlendiği biyolojik olayların sekteye uğramasına neden olacağı düşünülmektedir. Karaciğerin Kupffer ve hepatoselüler hücrelerinin peptid yapıdaki bazı hormonları da sentezlediği birçok çalışma ile tespit edilmiş olup [131], çalışmamızda da bu hücrelerin birer endokrinal hücre karakteristiği taşıdığı rapor edildi.

Çalışmamızda Tablo 3.8'de görüldüğü gibi sıçanların VKİ ve diğer biyokimyasal parametreleri karaciğer Sal-α ve Sal-β ile beyin Sal-α ve Sal-β gibi parametrelerle korelasyon tespit edilmiştir. Daha önce VKİ'ler ile pozitif korelasyon tespit edilmiş olup, çalışmamızda da yukarıda bahsi geçen parametrelerle pozitif korelasyonlar rapor edildi.

Sonuç olarak bu çalışmada beynin epitel hücre tabakasının hem Sal-α hem de Sal-β'yi sentezlediği İHK olarak gösterildi. MetS'e bağlı olarak Sal-α ve Sal-β sentezlerinin azaldığı ve bu azalmaların dolaşımdaki miktarlarına da yansıdığı tespit edildi. Bu çalışmada yine karaciğer dokusunun Kupffer ve hepatoselüler hücrelerinin hem Sal-α ve hem de Sal-β'yi sentezlediği İHK olarak gösterildi. Beyin dokusunda olduğu gibi MetS'e bağlı olarak gerek Sal-α ve gerekse Sal-β'nin azaldığı, bu azalmanın dolaşımdaki Sal-α ve Sal-β miktarlarına da yansıdığı rapor edildi. Sıçanların VKİ'leri ile bir çok diğer parametreler arasında korelasyon bulundu. Dolaşımdaki Sal-α ve Sal-β'nin MetS'le derişimleri azaldığı için bu parametrenin ATP III MetS tanı kriterlerinden (glukoz, HDL-K, hipertansiyon, TG ve VKİ) biri olabileceğini düşünmekteyiz. Bu da salusin peptidlerinin, dünya genelinde yaygınlaşan MetS'in erken tanı kriterleri arasında yardımcı olabileceği ve hastalığın takip ve kontrolünde yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

İçme sularına katılan %10 fruktozla *Sprague-Dawley* türü sıçanlarda üç ayın sonunda MetS oluşabileceği gözlendi. Sonuçlarımıza göre azalan salusinlerin replasman yoluyla fizyolojik sınırlara çıkarılmasının MetS'in neden olduğu olumsuz etkileri ortadan kaldıracağı ve organizmanın daha kaliteli bir yaşam sürmesine katkı yapacağını düşünmekteyiz.

4.1. Öneriler

a) MetS oluşturulduktan sonra azalan Sal-α ve Sal-β'nin yerine konulmasıyla ATP III kriterlerinde ne tür değişikliklerin olduğunu gözlemek için yeni bir deney dizayn edilmesi,

b) Yine MetS oluşturularak hipotansif ve hipertansif etkili peptitlerin kardiyovasküler sistem dokularında sentezlerinin nasıl değiştiğini ortaya koyarak dünya genelinde birincil derecede ölüme neden olan kardiyovasküler hastalıkların etiyopatolojisinin aydınlatılması için yapılacak çalışmaların bilime katkı yapacağını düşünmekteyiz.

5. KAYNAKLAR

[1] **Zimmet, P., Magliano, D., Matsuzawa, Y., Alberti, G. and Shaw, J.,** 2005. The metabolic syndrome: A global public health problem and a new definition, *J. Atheroscler. Thromp.*, **12,** 295–300.

[2] **Ersanlı, M.,** 2003. İnsülin Direnci ve Sonuçları, *Lipid Gündemi*.

[3] **Alberti, G.,** 2005. Introduction to the metabolic syndrome, *Eur. Heart. J.,* **7**, 3–5.

[4] **Alexander, C.M., Landsman, P.B., Teutsch, S.M. and Haffner, S.M.,** 2003. NCEP-Defined metabolic syndrome, diabetes, and prevelance of coronary hearth disease among NHANES III participants age 50 years and older, *Diabetes,* **52,** 1210-1214.

[5] **Reaven, G.M.,** 1988. Role of insulin resistance in human disease, *Diabetes*, **37**, 1595-1607.

[6] **İslamoğlu, Y., Koplay, M., Sunay, S. ve Açıkel, M.,** 2008. Obezite ve metabolik sendrom, *Tıp. Arş. Derg.*, **6,** 168-174.

[7] **Grundy, S.M.,** 2006. Does the metabolic syndrome exist? *Diabetes Care,* **29**, 1689-1692.

[8] **Handelsman, Y.,** 2009. Metabolic syndrome pathophysiology and clinical presentation, *Toxicol. Pathol.*, **37,** 18-20.

[9] **Reaven, G.M.,** 2005. The Metabolic Syndrome: Requiescat in pace, *Clin. Chem.*, **51,** 931–938.

[10] **Vuksan, V., Sievenpiper, J.L., Owen, R., Swilley, J.A., Spadafora, P., Jenkins, D.J., Vidgen, E., Brighenti, F., Josse, RG., Leiter, L.A., Xu, Z. and Novokmet, R.,** 2000. Beneficial effects of viscous dietary fiber from Konjac-Mannan in subjects with the insulin resistance syndrome, *Diabetes Care,* **23,** 9-14.

[11] **Cruz, M.L. and Goran, M.,** 2004. The metabolic syndrome in children and adolescents, *Curr. Diabetes. Rep.*, **4,** 53-62.

[12] **Balkau, B., Vernay, M., Mhamdi, L., Novak, M., Arondel, D., Vol, S., Tichet, J. and Eschwège, E.,** 2003. The Incidence and Persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) Metabolic Syndrome, The French D.E.S.I.R. Study, *Diabetes. Metab.,* **29,** 526-532.

[13] **Mattsson, N., Rönnemaa, T., Juonala, M., Viikari, J.S. and Raitakari, O.T.,** 2007. The prevalance of the metabolic syndrome in young adults. The cardiovascular risk in young Finns study, *J. Intern. Med.,* **261**, 159–169.

[14] **Ford, E.S. and Giles, W.H.,** 2003. A comparison of the prevalance of the metabolic syndrome using two proposed definitions, *Diabetes Care*, **26,** 575-581.

[15] **Aguilar-Salinas, C.A., Rojas, R., Gómez-Pérez, F.J., Valles, V., Rios-Torres, J.M., Franco, A., Olaiz, G., Rull, J.A. and Sepúlveda, J.,** 2004. High prevalence of metabolic syndrome in Mexico, *Arch. Med. Res.,* **35,** 76-81.

[16] **Moller, D.E. and Kaufman, K.D.,** 2005. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective, *Annu. Rev. Med.,* **56,** 45-62.

[17] **Nugent, A.P.,** 2004. The metabolic Syndrome, *Brit. Nutr. Found. Bull.,* **29,** 36-43.

[18] **Onat, A. ve Sansoy, V.,** 2002. Halkımızda koroner hastalığın baş suçlusu metabolik sendrom: sıklığı, unsurları, koroner risk ile ilişkisi ve yüksek risk kriterleri, *Türk. Kardiyol. Dern. Arş*., **30,** 8-15.

[19] **Karcıer-Münipoğlu, S.,** 2006. Metabolik sendromun tanı ve tedavisi, Türkiye Klinikleri *J. Int. Med. Sci.,* **2,** 21-29.

[20] Metabolik Sendrom Araştırma Grubu, 2004. *METSAR sonuçları*. Antalya: *XX. Ulusal. Kard. Kong.,*

[21] **Hatun, Ş. ve Çizmecioğlu, F.,** 2005. Çocukluk çağında metabolik sendrom, *Çocuk. Sağl. Hast. Derg.,* **48,** 257-265.

[22] **Ağırbaşlı, M., Çakır, S., Özme, S. and Ciliv, G.,** 2006. Metabolic syndrome in Turkish children and adolescent, *Metabolism.,* **55,** 1002-1006.

[23] http://www.nature.com/nm/poster/eposter_full.html. 16 Şubat 2012.

[24] **Alberti, K.G. and Zimmet, P.Z.,** 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation, *Diabet. Med.,* **15,** 539-553.

[25] **Balkau, B. and Charles, M.A.,** 1999. Comment on the provisional report from the WHO consultation, European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR), *Diabet. Med.,* **16,** 442–443.

[26] Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2001. *JAMA,* **285,** 2486-2497.

[27] American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for growth hormone use in adults and children, 2003 update. *Endocr. Pract.,* **9,** 65-76.

[28] **Grundy, S.M., Cleeman, J.I., Daniels, S.R., Donato, K.A., Eckel, R.H., Franklin, B.A., Gordon, D.J., Krauss, R.M., Savage, P.J., Smith, S.C., Spertus, J.A. and Costa, F.,** 2005. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute Scientific Statement, *Circulation*, **112,** 2735-2752.

[29] http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf, 13 Mart 2012.

[30] **Bruce, K.D., Byrne, C.D.,** 2009. The metabolic syndrome: Common origins of a multifactorial disorder, *Postgrad. Med. J*., **85**, 614-621.

[31] **Gajda, A.M., Pellizzon, M.A., Ricci, M.R. and Edward, A.,** 2007. Diet-induced metabolic syndrome in rodent models. *Animal LAB News*, A discussion of how diets made from purified ingredients influence the phenotypes of the MS in commonly used rodent models.

http://www.researchdiets.com/OSD/DIDM/ metabolic.htm, 10 Şubat 2012.

[32] **Kasim-Karakas, S.E., Vriend, H., Almario, R., Chow, L.C. and Goodman, M.N.,** 1996. Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters, *J. Lab. Clin. Med.,* **128,** 208-213.

[33] **Wilson, T.A., Nicolosi, R.J., Delaney, B., Chadwell, K., Moolchandani, V., Kotyla, T., Ponduru, S., Zheng, G.H., Hess, R., Knutson, N., Curry, L., Kolberg, L., Goulson, M. and Ostergren, K.,** 2004. Reduced and high molecular weight barley beta-glucans decrease plasma total and non-HDL-cholesterol in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters. *J. Nutr.,* **134**, 2617-2622.

[34] **Zern, T.L., West, K.L. and Fernandez, M.L.,** 2003. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs, *J. Nutr.,* **133,** 2268-2272.

[35] **Cos, E., Ramjiganesh, T., Roy, S., Yoganathan, S., Nicolosi, R.J. and Fernandez, M.L.,** 2001. Soluble fiber and soybean protein reduce atherosclerotic lesions in guinea pigs. Sex and hormonal status determine lesion extension, *Lipids,* **36,** 1209-1216.

[36] **Surwit, R.S., Feinglos, M.N., Rodin, J., Sutherland, A., Petro, A.E., Opara, E.C., Kuhn, C.M. and Rebuffé -Scrive, M.,** 1995. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice, *Metabolism*, **44**, 645-651.

[37] **Nishina, P.M., Lowe, S., Verstuyft, J., Naggert, J.K., Kuypers, F.A. and Paigen, B.,** 1993. Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice, *J. Lipid. Res*., **34,** 1413-1422.

[38] **Prpic, V., Watson, P.M., Frampton, I.C., Sabol, M.A., Jezek, G.E. and Gettys, T.W.,** 2002. Adaptive changes in adipocyte gene expression differ in AKR/J and SWR/J mice during diet-induced obesity, *J. Nutr*., **132**, 3325-3332.

[39] **Lichtman, A.H., Clinton, S.K., Iiyama, K., Connelly, P.W., Libby, P. and Cybulsky, M.I.,** 1999. Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. *Arterioscler. Thromb.Vasc. Biol.*, **19,** 1938-1944.

[40] **Corsetti, J.P., Sparks, J.D., Peterson, R.G., Smith, R.L. and Sparks, C.E.,** 2000. Effect of dietary fat on the development of non- insulin dependent diabetes mellitus in obese Zucker diabetic fatty male and female rats. *Atherosclerosis,* **148**, 231-241.

[41] **Ogihara, T., Asano, T., Ando, K., Sakoda, H., Anai, M., Shojima, N., Ono, H., Onishi, Y., Fujishiro, M., Abe, M., Fukushima, Y., Kikuchi, M. and Fujita, T.,** 2002. High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats, *Hypertension,* **40**, 83- 89.

[42] **Kobayashi, N., Yoshida, K., Nakano, S., Ohno, T., Honda, T., Tsubokou, Y. and Matsuoka, H.,** 2006. Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts, *Hypertension,* **47,** 671-679.

[43] **Dobrian, A.D., Davies, M.J., Prewitt, R.L. and Lauterio, T.J.,** 2000. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity, *Hypertension,* **35,** 1009-1015.

[44] **Ghibaudi, L., Cook, J., Farley, C., van Heek, M. and Hwa, J.J.,** 2002. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats, *Obes. Res.,* **10,** 956-963.

[45] **Pagliassotti, M.J., Prach, P.A., Koppenhafer, T.A. and Pan, D.A.,** 1996. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats, *Am. J. Physiol.,* **271,** 1319-1326.

[46] **Pagliassotti, M.J., Gayles, E.C., Podolin, D.A., Wei, Y. and Morin, C.L.,** 2000. Developmental stage modifies diet-induced peripheral insulin resistance in rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,* **278,** 66-73.

[47] **Sanchez-Lozada, L.G., Tapia, E., Jimenez, A., Bautista, P., Cristobal, M., Nepomuceno, T., Soto, V., Avila-Casado, C., Nakagawa, T., Johnson, R.J., Herrera-Acosta, J. and Franco, M.,** 2007. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.,* **292,** 423-429.

[48] **Elliott, S.S., Keim, N.L., Stern, J.S., Teff, K. and Havel, P.J.,** 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome, *Am. J. Clin. Nutr.,* **76,** 911-922.

[49] **Perheentupa, J., Raivio, K.,** 1967. Fructose-induced hyperuricaemia, *Lancet,* **2,** 528-31.

[50] **Stirpe, F., Della-Corte, E., Bonetti, E., Abbondanza, A., Abbati, A. and De-Stefano, F.,** 1970. Fructose-induced hyperuricaemia*, Lancet*, **2,** 1310-1311.

[51] **Stavric, B., Johnson, W.J., Clayman, S., Gadd, R.E. and Chartrand, A.,** 1976. Effect of fructose administration on serum urate levels in the uricase inhibited rat, *Experientia,* **32,** 373-374.

[52] **Nakagawa, T., Hu, H., Zharikov, S., Tuttle, K.R., Short, R.A., Glushakova, O., Ouyang, X., Feig, D.I., Block, E.R., Herrera-Acosta, J., Patel, J.M. and Johnson, R.J.,** 2006. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **290**, 625–631.

[53] **Mayes, P.A.,** 1993. Intermediary metabolism of fructose, *Am. J. Clin. Nutr.,* **58,** 754-765.

[54] **Bray, G.A.,** 2008. Fructose: should we worry? *Int. J. Obes. (Lond).*, **32,** 127-131.

[55] **Bantle, J.P., Raatz, S.K., Thomas, W. and Georgopoulos, A.,** 2000. Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects, *Am. J. Clin. Nutr.,* **72,** 1128–1134.

[56] **Soleimani, M.,** 2011. Dietary fructose, salt absorption and hypertension in metabolic syndrome: towards a new paradigm, *Acta. Physiol. (Oxf).,* **201,** 55-62.

[57] **Bray, GA., Nielsen, SJ. and Popkin, B.M.,** 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity, *Am. J. Clin. Nutr.,* **79,** 537–543.

[58] **Junqueira, L.C. and Carneiro, J.,** 2009.Temel Histoloji Text ve Atlas, (çev. edt: Solakoğlu, S. ve Aytekin, Y.,) *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul.

[59] **Yıldırım, M.,** 2000. İnsan Anatomisi, *Nobel Tıp Kitabevleri 5. baskı,* İstanbul.

[60] **Ovale, W.K. and Nahirney, P.C.,** 2009. Netter Temel Histoloji, (çev edt: Müftüoğlu, S., Kaymaz, F. ve Atilla, P.,). *Güneş Tıp Kitabevi,* İstanbul.

[61] **Kierszenbaum, A.L.,** 2006. Histoloji ve Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş. (çev. edt: Demir, R.,) *Palme Yayıncılık,* Ankara.

[62] **Junqueira, L.C., Carneiro, J. and Kelley, R.O.,** 1998. Temel Histoloji, (çev edt: Yener, A.,) *Barış Kitapçılık,* İstanbul.

[63] **Batman, F. ve Arslan, S.,** 1996. Karaciğer fizyolojisi, (çev edt: Sayek, İ.,) *Temel cerrahi*, **Cilt 2**, 1205.

[64] **Guyton, A.C. and Hall, J.E.,** 2007. Tıbbi Fizyoloji, *Nobel Tıp Kitabevleri 11.Basım*, İstanbul.

[65] **Andreoli, T.E., Bennett, J.C. and Carpenter, J.C.,** 1995. Sarılık, bilirubin metabolizması bölüm 40, *Cecil Essentials Of Medicine 3rd ed.,* 323.

[66] **Shichiri, M., Ishimaru, S., Ota, T., Nishikawa, T., Isogai, T. and Hirata, Y.,** 2003. Salusins newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities, *Nat. Med.*, **9,** 1166–1172.

[67] **Sato, K., Koyama, T., Tateno, T., Hirata, Y. and Shichiri, M.,** 2006. Presence of immunoreactive salusin-α in human serum and urine, *Peptides*, **27,** 2561-2566.

[68] **Sato, K., Sato, T., Susumu, T., Koyama, T. and Shichiri, M.,** 2009. Presence of immunoreactive salusin-β in human plasma and urine, *Regul. Pept.,* **158,** 63-67.

[69] **Kimoto, S., Sato, K., Watanabe, T., Suguro, T., Koyama T. and Shichiri, M.,** 2010. Serum levels and urinary excretion of salusin-α in renal insufficiency, *Regul. Pept.,* **162,** 129-132.

[70] **Sato, K., Fujimoto, K., Koyama, T. and Shichiri, M**., 2010. Release of salusin-β from human monocytes/macrophages, *Regul. Pept.,* **162,** 68-72.

[71] **Aydın, S.,** 2011. Kardiyopulmoner Bypassın Apelin ve Salusin Expresyonlarına Etkileri ve Salusinin Aort, Safen, Ven ve Arteryel Greftlerde Lokal Olarak Sentezlenip Sentezlenmediğinin Araştırılması, *Tıpta Uzmanlık Tezi,* D.Ü. Diyarbakır.

[72] **Aydin, S., Eren, M.N., Aydin, S., Ozercan, İ.H. and Dagli, A.F.,** 2012. The bioactive peptides salusins and apelin-36 are produced in human arterial and venous tissues and the changes of their levels during cardiopulmonary bypass, *Peptides*, **37,** 233-239.

[73] www.anaspec.com/products/product.asp?id=38604&productid=20437, 23 Subat 2012.

[74] **Watanabe, T., Suguro, T., Sato, K., Koyama, T., Nagashima, M., Kodate, S., Hirano, T., Adachi, M., Shichiri, M. and Miyazaki, A.,** 2008. Serum salusin-α levels are decreased and correlated negatively with carotid atherosclerosis in essential hypertensive patients, *Hypertens. Res*., **31,** 463–468.

[75] **Watanabe, T., Nishio, K., Kanome, T., Matsuyama, T.A., Koba, S., Sakai, T., Sato, K., Hongo, S., Nose, K., Ota, H., Kobayashi, Y., Katagiri, T., Shichiri, M. and Miyazaki, A.,** 2008. Impact of salusin-α and -β on human macrophage foam cell formation and coronary atherosclerosis, *Circulation*, **117,** 638–648.

[76] **Nagashima, M., Watanabe, T., Shiraishi, Y., Morita, R., Terasaki, M., Arita, S., Hongo, S., Sato, K., Shichiri, M., Miyazaki, A. and Hirano, T.,** 2010. Chronic infusion of salusin-α and -β exerts opposite effects on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice, *Atherosclerosis,* **212,** 70–77.

[77] **Aydın, S., Eren, M.N. and Aydın, S.,** 2012. Kardiyovaskuler sistemde salusin α ve β'nın fizyolojisi ve klinik rolü, *J. Cardiovasc. Sci.,* in press.

[78] **Izumiyama, H., Tanaka, H., Egi, K., Sunamori, M., Hirata, Y. and Shichiri, M.,** 2005. Synthetic salusins as cardiac depressors in rat, *Hypertension,* **45,** 419–425.

[79] www.anaspec.com/products/product.asp?id=38603&productid=20436, 23 Şubat 2012.

[80] **Catak, Z.,** 2012. Fruktozla Metabolik Sendrom Oluşturulmuş Ratlarda Serum ve Gonadal Ghrelin, Obestatin ve Nesfatin-1 Ekspresyonlarının İncelenmesi, *Tıpta Uzmanlık Tezi*, F.Ü. Elazığ.

[81] **Sahin, I., Aydin, S., Ozkan, Y., Dagli, AF., Akin, K.O., Guzel, S.P., Catak, Z. and Ozercan, M.R.,** 2011. Diet-induced obesity suppresses ghrelin in rat gastrointestinal tract and serum, *Mol. Cell. Biochem.,* **355,** 299-308.

[82] **Hosoda, H., Doi, K., Nagaya, N., Okumura, H., Nakagawa, E., Enomoto, M., Ono, F. and Kangawa, K.,** 2004. Optimum collection and storage conditions for ghrelin measurements: octanoyl modification of ghrelin is rapidly hydrolyzed to desacyl ghrelin in blood samples, *Clin. Chem.*, **50,** 1077-1080.

[83] **Sato, K., Fujimoto, K., Koyama, T. and Shichiri., M.** 2010. Release of salusin-beta from human monocytes/macrophages, *Regul. Pept.,* **162,** 68-72.

[84] **Kojima, M. and Kangawa, K.,** 2005. Ghrelin: structure and function, *Physiol. Rev.,* **85,** 495-522.

[85] **Aydın, S.,** 2007. Ghrelin Hormonunun Keşfi: Araştırmaları ve Klinik Uygulamaları, *Turk. J. Biochem.,* **32,** 76-89.

[86] **Friedewald, W.T., Levy, R.I. and Fredrickson, D.S.,** 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge, *Clin. Chem.,* **18,** 499-502.

[87] **Şahin, İ.,** 2009. Diyetle indüklenmiş, obez sıçanlarda ghrelinin organ dağılım haritalarıyla birlikte serum ghrelin, paraoksonaz ve arilesteraz düzeylerinin araştırılması, *Doktora tezi,* F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.

[88] **Aydin, S.,** 2007. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics, *J. Biochem. Mol. Biol.,* **40,** 29-35.

[89] **Coons, A.H., Creech, H.J. and Jones, R.N.,** 1941. Immunological properties of antibody containing a fluorescent group, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **47,** 200-202.

[90] **Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H.,** 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, *J. Histochem. Cytochem*., **29,** 577–580

[91] **Shahraki, M.R., Harati, M. and Shahraki, A.R.,** 2011. Prevention of high fructose-induced metabolic syndrome in male wistar rats by aqueous extract of *Tamarindus indica* seed, *Acta. Med. Iran.,* **49,** 277-283.

[92] **Amin, K.A. and Nagy, M.A.,** 2009. Effect of Carnitine and herbal mixture extract on obesity induced by high fat diet in rats, *Diabetol. Metab. Syndr.,* **1,** 1-14.

[93] **Abdelmalek, M.F., Suzuki, A., Guy, C., Unalp-Arida, A., Colvin, R., Johnson, R.J. and Diehl, A.M.,** 2010. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology,* **51,** 1961-1971.

[94] **Nakanishi, N., Suzuki, K. and Tatara, K.,** 2004. Serum gamma-glutamyltransferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men, *Diabetes Care,* **27,** 1427-1432.

[95] **Love-Osborne, K.A., Nadeau, K.J., Sheeder, J., Fenton, L.Z. and Zeitler, P.,** 2008. Presence of the metabolic syndrome in obese adolescents predicts impaired glucose tolerance and nonalcoholic fatty liver disease, *J. Adolesc. Health.,* **42,** 543-548.

[96] **Wannamethee, S.G., Shaper, A.G., Lennon, L. and Whincup, P.H.,** 2005. Hepatic enzymes, the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men, *Diabetes Care,* **28,** 2913-2918.

[97] **Park, H.S., Han, J.H., Choi, K.M. and Kim, S.M.,** 2005. Relation between elevated serum alanine aminotransferase and metabolic syndrome in Korean adolescents, *Am. J. Clin. Nutr.,* **82,** 1046-1051.

[98] **Kanase, K.G., Yadav, V.D., Undale, V.R., Upasani, C.D. and Bhosale, A.V.,** 2011. Effect of pioglitazone and irbesartan on hemodynamic and metabolic parameters in fructose induced diabetes as well as hypertensive rats, *JPRO.,* **6,** 175-179.

[99] **More, S., Kharwade, R., Bawankar, D., Santoshkumar, G. and Chopde, C.T.,** 2011. Improvement of insulin resistance by resveratrol & resveratrol rich beverages, *J. Pharmacol. Toxicol.,* **1,** 34-40.

[100] **Dube, A., Chaudhary, S., Tambe, S., Bodhankar, S.L. and Piplani, P.,** 2010. Metabolic and haemodynamic effects of pp-28 in fructose-fed wistar rats, *Pharmacologyonline,* **3,** 41-51.

[101] **Axelsen, L.N., Lademann, J.B., Petersen, J.S., Holstein-Rathlou, N.H., Ploug, T., Prats, C., Pedersen, H.D. and Kjølbye, A.L.,** 2010. Cardiac and metabolic changes in long-term high fructose-fat fed rats with severe obesity and extensive intramyocardial lipid accumulation, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,* **298,** 1560-1570.

[102] **Kotronen, A., Westerbacka, J., Bergholm, R., Pietiläinen, K.H. and Yki-Järvinen, H.,** 2007. Liver fat in the metabolic syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* **92,** 3490-3497.

[103] **Ekstedt, M., Franzén, L.E., Mathiesen, U.L., Thorelius, L., Holmqvist, M., Bodemar, G. and Kechagias, S.,** 2006. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes, *Hepatology,* **44,** 865-73.

[104] **Marchesini, G., Avagnina, S., Barantani, E.G., Ciccarone, A.M., Corica, F., Dall'Aglio, E., Dalle Grave, R., Morpurgo, P.S., Tomasi, F. and Vitacolonna, E.,** 2005. Aminotransferase and gamma-glutamyltranspeptidase levels in obesity are associated with insulin resistance and the metabolic syndrome, *J. Endocrinol. Invest.,* **28,** 333-339.

[105] **Donati, G., Stagni, B., Piscaglia, F., Venturoli, N., Morselli-Labate, A.M., Rasciti, L. and Bolondi, L.,** 2004. Increased prevalence of fatty liver in arterial hypertensive patients with normal liver enzymes: role of insulin resistance, *Gut,* **53,** 1020-1023.

[106] **Hsieh, M.H., Ho, C.K., Hou, N.J., Hsieh, M.Y., Lin, W.Y., Yang, J.F., Chiu, C.C., Huang, J.F., Chang, N.C., Wang, C.L., Dai, C.Y., Chuang, W.L. and Yu, ML.,** 2009. Abnormal liver function test results are related to metabolic syndrome and BMI in Taiwanese adults without chronic hepatitis B or C*, Int. J. Obes (Lond).*, **33,** 1309-1317.

[107] **Jeong, S.K., Nam, H.S., Rhee, J.A., Shin, J.H., Kim, J.M. and Cho, K.H.,** 2004. Metabolic syndrome and ALT: a community study in adult Koreans, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.,* **28,**1033-1038.

[108] **Marques-Vidal, P., Pécoud, A., Hayoz, D., Paccaud, F., Mooser, V., Waeber, G. and Vollenweider, P.,** 2010. Normal weight obesity: relationship with lipids, glycaemic status, liver enzymes and inflammation, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.,* **20,** 669-675.

[109] **Nannipieri, M., Gonzales, C., Baldi, S., Posadas, R., Williams, K., Haffner, S.M., Stern, M.P. and Ferrannini, E.,** 2005. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study, *Diabetes Care.,* **28,** 1757-1762.

[110] **Zhou, J., Cerny, V. and Lehmann, C.,** 2011. Fructose-the sweet poison, *Jpen. J. Parenter. Enteral. Nutr.,* **35,** 158-159.

[111] **Mattioli, L.F., Thomas, J.H., Holloway, N.B., Schropp, K.P. and Wood, J.G.,** 2011. Effects of intragastric fructose and dextrose on mesenteric

microvascular inflammation and postprandial hyperemia in the rat, *Jpen. J. Parenter. Enteral. Nutr.,* **35,** 223-228.

[112] **Roncal-Jimenez, C.A., Lanaspa, M.A., Rivard, C.J., Nakagawa, T., Sanchez-Lozada, L.G., Jalal, D., Andres-Hernando, A., Tanabe, K., Madero, M., Li, N., Cicerchi, C., Mc Fann, K., Sautin, Y.Y. and Johnson, R.J.,** 2011. Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake, *Metabolism,* **60,** 1259-1270.

[113] **See, L.C., Kuo, C.F., Chuang, F.H., Shen, Y.M., Ko, Y.S., Chen, Y.M. and Yu, K.H.,** 2011. Hyperuricemia and metabolic syndrome: associations with chronic kidney disease, *Clin. Rheumatol.,* **30,** 323-330.

[114] **Mohan, M., Jaiswal, BS. and Kasture, S.,** 2009. Effect of Solanum torvum on blood pressure and metabolic alterations in fructose hypertensive rats, *J. Ethnopharmacol.,* **126,** 86–89.

[115] **Renna, N.F., Vazquez, M.A., Lama, M.C., González, E.S. and Miatello, R.M.,** 2009. Effect of chronic aspirin administration on an experimental model of metabolic syndrome*, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.,* **36**, 162–168.

[116] **Zhao, C.X., Xu, X., Cui, Y., Wang, P., Wei, X., Yang, S., Edin, M.L., Zeldin, D.C. and Wang, D.W.,** 2009. Increased endothelial nitric-oxide synthase expression reduces hypertension and hyperinsulinemia in fructose-treated rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.,* **328,** 610-620.

[117] **Rafiq, M. and Mitra, S.K.,** 2010. Purified Methanolic Extract of *Salacia reticulata* Wight. Ameliorates Insulin Resistance and Metabolic Alterations in Rats Fed High Fructose Diet, *Int. J. Pharmacol.*, **6,** 386-392.

[118] **Reddy, S.S., Ramatholisamma, P., Ramesh, B., Baskar, R. and Saralakumari, D.,** 2009. Beneficiary effect of *Tinospora cordifolia* against high-fructose diet induced abnormalities in carbohydrate and lipid metabolism in Wistar rats, *Horm. Metab. Res.,* **41,**741-746.

[119] **Lustig, R.H.,** 2010. Fructose: Metabolic, hedonic, and societal parallels with ethanol, *J. Am. Diet. Assoc.,* **110,** 1307-1321.

[120] **Moreno, J.A. and Hong, E.,** 2012. A single oral dose of fructose induces some features of metabolic syndrome in rats: Role of oxidative stress, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.,* in press.

[121] **Thakker, J.K., DiMarchi, R., MacDonald, K. and Caro, J.F.,** 1989. Effect of insulin and insulin-like growth factors I and II on phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate breakdown in liver from humans with and without type II diabetes, *J. Biol. Chem.,* **264,** 7169-7175.

[122] **Ford, E.S., Giles, W.H. and Dietz, W.H.,** 2002. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, *JAMA,* **287,** 356-359.

[123] **Pyörälä, M., Miettinen, H., Halonen, P., Laakso, M. and Pyörälä, K.,** 2000. Insulin resistance syndrome predicts the risk of coronary heart disease and stroke in healthy middle-aged men: the 22-year follow-up results of

the Helsinki Policemen Study, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.,* **20,** 538-544.

[124] **Fan, X., Ding, Y., Brown, S., Zhou, L., Shaw, M., Vella, M.C., Cheng, H., McNay, E.C., Sherwin, R.S. and McCrimmon, RJ.,** 2009. Hypothalamic AMP-activated protein kinase activation with AICAR amplifies counterregulatory responses to hypoglycemia in a rodent model of type 1 diabetes, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,* **296,** 1702-1708.

[125] **Watanabe, T., Sato, K., Itoh, F., Iso, Y., Nagashima, M., Hirano, T. and Shichiri, M.,** 2011. The roles of salusins in atherosclerosis and related cardiovascular diseases, *J. Am. Soc. Hypertens.,* **5,** 359-365.

[126] **Suzuki, N., Shichiri, M., Akashi, T., Sato, K., Sakurada, M., Hirono, Y., Yoshimoto, T., Koyama, T. and Hirata, Y.,** 2007. Systemic distribution of salusin expression in the rat, *Hypertens. Res.,* **30,** 1255-1262.

[127] **Litherland, G.J., Hajduch, E., Gould, G.W. and Hundal, H.S.,** 2004. Fructose transport and metabolism in adipose tissue of Zucker rats: diminished GLUT5 activity during obesity and insulin resistance, *Mol. Cell. Biochem.,* **261,** 23-33.

[128] **Özdemir, N.,** 2011. Hellp sendromunda serum-plasental salusin ve ghrelin düzeylerinin araştırılması, Tıpta *Uzmanlık Tezi,* F.Ü. Elazığ.

[129] **Aydin, S., Dag, E., Ozkan, Y., Erman, F., Dagli, A.F., Kilic, N., Sahin, I., Karatas, F., Yoldas, T., Barim, A.O. and Kendir, Y.,** 2009. Nesfatin-1 and ghrelin levels in serum and saliva of epileptic patients: hormonal changes can have a major effect on seizure disorders, *Mol. Cell. Biochem.*, **328,** 49-56.

[130] **Field, B.C., Chaudhri, O.B. and Bloom, S.R.,** 2010. Bowels control brain: gut hormones and obesity, *Nat. Rev. Endocrinol.,* **6,** 444-453.

[131] **Scheuer, A., Grün, R. and Lehmann, F.G.,** 1981. Peptide hormones in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, *Oncodev. Biol. Med.,* **2,** 1-10.

ÖZGEÇMİŞ

17.12.1976 Elazığ doğumluyum. İlk ve ortaöğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 1999 yılında Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden Fakülte ve Üniversite ikincisi olarak mezun oldum. 1999-2001 yılları arasında Van ili Erciş ilçesinde sınıf öğretmeni olarak görev yaptım. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisansımı 2003 yılında tamamladım. Halen Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma görevlisi olarak görevime devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.