TC
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOR BİLEŞİKLERİNİN OBEZ TAVŞANLARDA LİPOPROTEİN ALT SINIFLARINA VE NÜKLEER HORMON RESEPTÖRLERİNE ETKİLERİ

Özgür YAMAN

DOKTORA TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Abdullah BAŞOĞLU

KONYA-2014

TC
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOR BİLEŞİKLERİNİN OBEZ TAVŞANLARDA LİPOPROTEİN ALT SINIFLARINA VE NÜKLEER HORMON RESEPTÖRLERİNE ETKİLERİ

Özgür YAMAN

DOKTORA TEZİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Abdullah BAŞOĞLU

Bu proje TÜBİTAK (Proje No: 112O400) ve FP7 Kapasiteler/Altyapılar kapsamında Avrupa Birliği (Proje No: BIO-NMR-00198) tarafından desteklenmiştir.

KONYA-2014

ÖNSÖZ

İnsanlarda obezite/tip 2 diabet ile ilişkili karaciğer yağlanması ciddi bir halk sağlığı problemine ulaşmıştır. Bu bozukluklar durağan olmayıp karaciğerde steatohepatitis, fibrozis ve kansere kadar ilerlemektedir. Sütçü sığırların karaciğer yağlanması ile ilişkili üretim hastalıklarının süt endüstrisine ekonomik kayıpları ve hayvan refahı endişeleri devam etmektedir. Gelişmiş ülkelerde kedi ve köpeklerde obezite sıklığı en az %20'dir. Beşeri ve veteriner hekimliği ilgilendiren bu ortak ve yaygın hastalıkların patojenik mekanizmalarının anlaşılması, onların önlenmesi ve tedavisi üzerine yoğun çalışmalar vardır. Son zamanlarda obezite, karaciğer yağlanması ve steatohepatitis ile ilgili olarak *'omik'* (metabolomik, proteomik, transkriptomik) çalışmalar dikkat çekmektedir. Bunlar arasında NMR (Nükleer manyetik rezonans) bazlı metabolomikler ve lipoprotein alt sınıfları ile glikoneogenik enzimler ve yağ asidi oksidasyonunda yer alan genlere yönelik transkriptomikler ön sırada yer almaktadır.

Anabilim Dalımız'da bu bozuklukların önlenmesi ve tedavisine bir alternatif olarak bor üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Borun deney hayvanlarında obezite, karaciğer yağlanması, mineral ve izelement metabolizması, lipid profili ve kemik dayanıklılığına etkinliği ile yine borun sütçü sığırlarda karaciğer yağlanmasını önlemedeki etkinliği konusunda bölümümüzde çalışmalar olmuş ve yayınlanmıştır. Bu çalışmalar kapsamında borun bahsedilen bozukluklara etkinliğinin NMR bazlı matabolomik değerlendirmesi de ilk defa bölümümüzde ortaya konmuştur. Borun obezite ve karaciğer yağlanması gibi bozuklukların patojenik mekanizmalarına etkinliğinin daha iyi anlaşılması için lipoprotein alt sınıflarına ve nükleer hormon reseptörlerine yönelik araştırmalara ihtiyaç duyulmasıyla bu proje ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada yüksek proteinli ve enerjili diyetle beslenen tavşanlarda obezite ve karaciğer yağlanmasına oranla karaciğerdeki dejenereatif değişiklikler dikkat çekici olmuştur. Bu değişiklikler, hayvanların içme sularına ilave edilen bor bileşikleriyle önlenmiş ve bu etkinlikte borik asidin öne çıktığı belirlenmiştir. Bu etkinliğin patojenik mekanizmalarının enerji ve yangı metabolizmasıyla ilgisi, geleneksel biyokimyasal parametrelerin dışında metabolomikler, lipoprotein alt sınıfları ve PPAR

(peroksizom proliferatörü ile aktive edilmiş reseptör) ailesi ile daha iyi anlaşılmış ve uzun süre bor kullanımı böbreklerde belirgin bir değişikliğe yol açmamıştır.

Sonuç olarak, bu proje ile yüksek protein ve enerjili diyetle obezite ve karaciğer yağlanmasından ziyade karaciğer yangısal ve dejeneratif değişikliklere yol açtığı belirlenmiştir. Bu bozuklukların bor bileşikleri (özellikle borik asit) ile önlenebileceği ve bunun patojenik mekanizmalarına etkinliği, yüksek teknoloji (NMR, real time-PCR, ICP-AES) kullanarak metabolomik ve transkriptomik çalışmalarla moleküler düzeyde daha iyi anlaşılmıştır.

Bu proje TÜBİTAK (Proje No: 112O400) ve FP7 Kapasiteler/Altyapılar kapsamında Avrupa Birliği (Proje No: BIO-NMR-00198) tarafından desteklenmiştir.

Doktara eğitimim süresince teorik ve pratik bilgilerinden yararlandığım sabır ve özenle ilgilenerek desteğini benden esirgemeyen başta danışmanım Prof. Dr. Abdullah BAŞOĞLU olmak üzere; çalışmamıza değerli katkılarını sunan Prof. Dr. Nuri BAŞPINAR, Prof. Dr. Mutlu SEVİNÇ'e ve çalışmalarımda kolaylık sağlayan tüm S.Ü. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne ve çalışanlarına içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Afyon Kocatepe Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde çalışmalarımızı yürütmemizde yardımcı olan bu merkezin müdürü Doç. Dr. Abdurrahman Fatih FİDAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne kadar her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteğini benden hiç bir zaman esirgemeyen değerli aileme her zaman, her koşulda yanımda oldukları için sonsuz teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR…… vi
ÇİZELGE, ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ…… viii
1. GİRİŞ……..... 1
1.1. Obezite, Karaciğer Yağlanması ve Steotohepatitis…… 1
1.1.1. İnsanlarda……. 1
1.1.2. Evcil Hayvanlarda…….……... 6
1.2. Metabolomikler…….....……... 8
1.3. Lipoproteinler ve Lipoprotein Metabolizması…… 10
1.4. Transkriptomikler ve Nükleer Hormon Reseptörleri……..... 13
1.4.1. İnsanlarda……...……..... 13
1.4.2. Sütçü sığırlarda PPAR ve karaciğer yağ asidi metabolizması……..... 16
1.5. Bor…….. 17
2. GEREÇ ve YÖNTEM…… 21
2. 1. Hayvanlar, Diyetler ve Bor…….…….. 21
2. 2. Vücut Kütlesi İndeksi…….……... 21
2. 3. Biyokimyasal Analizler…….…… 21
2. 4. NMR Analizleri……. 24
2. 5. RNA Extraksiyonu, cDNA Sentezi ve qPCR Analizi……... 26
2. 6. Bor Analizleri …….....……..... 25
2. 7. Histopatolojik İnceleme ……...……..... 27
2. 8. İstatistiksel Analizler……..... 27
3. BULGULAR…… 28
3. 1. Vücut ağırlıkları, yem-su tüketimleri, vücut kütle indeksleri……... 28
3. 2. Biyokimyasal Parametreler……... 29
3. 3. Metabolomik Değerlendirme……... 30
3. 4. Lipoprotein Alt Sınıfları…… 31
3. 5. Nükleer Hormon Reseptörleri ……..... 33
3. 6. Bor Seviyeleri……..... 33
3. 7. Histopatolojik Bulgular……..... 34

4. TARTIŞMA ……..... 38
5. SONUÇ ve ÖNERİLER …….. 44
6. ÖZET…… 45
7. SUMMARY…… 46
8. KAYNAKLAR……. 47
9. EKLER…….. 53
Ek A: Etik Kurul Kararı…… 52
10. ÖZGEÇMİŞ…… 54

SiMGELER VE KISALTMALAR

AOP	Antioksidan potansiyel
B	Bor
C	Karbon
CE	Kolesteril ester
CETP	Kolesteril ester transferaz protein
DM	Diabetes mellitus
cDNA	Komplemanter DNA
F	Flor
FC	Serbest kolesterol
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
H	Hidrojen
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
ICP-AES	Çift plazmalı atomik emisyon spektrofotometre
IDL	Orta dansiteli lipoprotein
IR	İnsulin rezistansı
İnt mnh	İnterstisyel mononükleer hücre infiltrasyonu
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LD50	Öldürücü doz %50
LIPO	Lipoprotein lipid
LMWM	Düşük molekül ağırlıklı metabolitler
LPO	Lipid peroksidasyon
MCHC	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
M1	Proenflamator makrofajlar
M2	Antienflamator makrofajlar
mRNA	Mesajcı RNA
MUFA	Tekli doymamış yağ asitleri
MUT	Metilmalonil-CoA mutaz
N	Azot
NAFLD	Alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalığı
NASH	Alkolik olmayan steatohepatitis
NEFA	Esterleşmemiş yağ asidi

NMR	Nükleer manyetik rezonans
P	Fosfor
PC	Pirüvat karboksilaz
PCCA	Propionil CoA karboksilaz, alfa polipeptid
PCK1	Fosfoenol pirüvat karboksikinaz 1
PDHA1	Pirüvat dehidrogenaz alfa 1
PDK4	Pirüvat dehidro kinaz, izozim 4
PL	Fosfolipidler
PPAR	Peroksizom proliferatörü ile aktive edilmiş reseptör
qPCR	Kantitatif PCR
RNA	Ribonükleik asit
RXR-α	Retinoik reseptör alfa
SCFA	Kısa zincirli yağ asitleri
SLCA2, A3	İnsan anyon değiştirici genler
SREBP	Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein
TAG	Triasilgliserol
TNF	Tümör nekrozis faktör
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ÇİZELGE, ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ

1. Bölüm'ün Çizelge, Şekil ve Resimleri:

Şekil 1.1. Nonalkolik karaciğer yağlanmasının doğal süreci.

Şekil 1.2. Nonalkolik fatty liver disease (Primer karaciğer yağlanması).

Şekil 1.3. Sütçü sığırlarda karaciğer yağlanmasının patojenik mekanizmaları.

Şekil 1.4. Tipik bir lipoproteinin şematik diyagramı.

Şekil 1.5. HDL metabolizması.

Şekil 1.6. Hepatositlerde yağ asidi metabolizmasının PPAR-α tarafından regülasyonu.

Şekil 1.7. Adipoz dokuda lipid metabolizmasının PPAR γ ve SREBP-1 tarafından regulasyonu.

Şekil 1.8. PPAR ailesinin bazı dokulardaki aktivasyon inhibisyon etkileri.

2. Bölüm'ün Çizelge, Şekil ve Resimleri:

Çizelge 2.1. Yüksek enerjili diyet içeriği.

Resim 2.1. Deneme hayvanlarının bireysel kafeslerde genel görünümü.

Resim 2.2. Bir kafesin yakından görünümü.

Resim 2.3. Tartım işlemleri.

Resim 2.4. NMR bazlı metabolomiklerin Masarykova Üniversitesi NMR Merkezi'nde (Bruno, Çek Cumhuriyeti) ölçümü.

3. Bölüm'ün Çizelge, Şekil ve Resimleri:

Çizelge 3.1. Tavşanların yem tüketimi.

Çizelge 3.2. Vücut ağırlıkları ve 3 ay sonundaki vücut kütle indeksleri.

Çizelge 3.3. Su tüketimi.

Çizelge 3.4. Plazma örneklerinde biyokimyasal parametreler.

Çizelge 3.5. NMR bazlı metabolit konsantrasyonları (µmol/ml).

Çizelge 3.6. Gruplararası lipoprotein alt sınıfların partikül seviyeleri (mmol/L).

Çizelge 3.7. Gruplararası nükleer hormon reseptörleri.

Çizelge 3.8. Real-time PCR analizinde kullanılan PPAR-α, β/δ, ve γ genlerin primerleri.
Çizelge 3.9. Bor seviyeleri.
Çizelge 3.10. Karaciğerdeki histopatolojik lezyonların gruplara dağılımı.
Çizelge 3.11. Böbrekteki histopatolojik lezyonların gruplara dağılımı.
Resim 3.1. Kontrol grubu hayvanlarından bir örnek ve viseral yağlanma.
Resim 3.2. Boraks grubu hayvanlardan bir örnek ve viseral yağlanma az.
Resim 3.3. Susuz boraks grubu hayvanlardan bir örnek ve viseral yağlanma çok az.
Resim 3.4. Borik asit grubu hayvanlardan bir örnek.
Resim 3.5. Böbrekte tubuler dejenerasyonlar.
Resim 3.6. Böbrekte tubuler dejenerasyon ve dilatasyon.
Şekil 3.1. NMR spektral karakteristikler ve iki moleküler pencere.

1.GİRİŞ

1.1. Obezite, Karaciğer Yağlanması ve Steatohepatitis

1.1.1. İnsanlarda

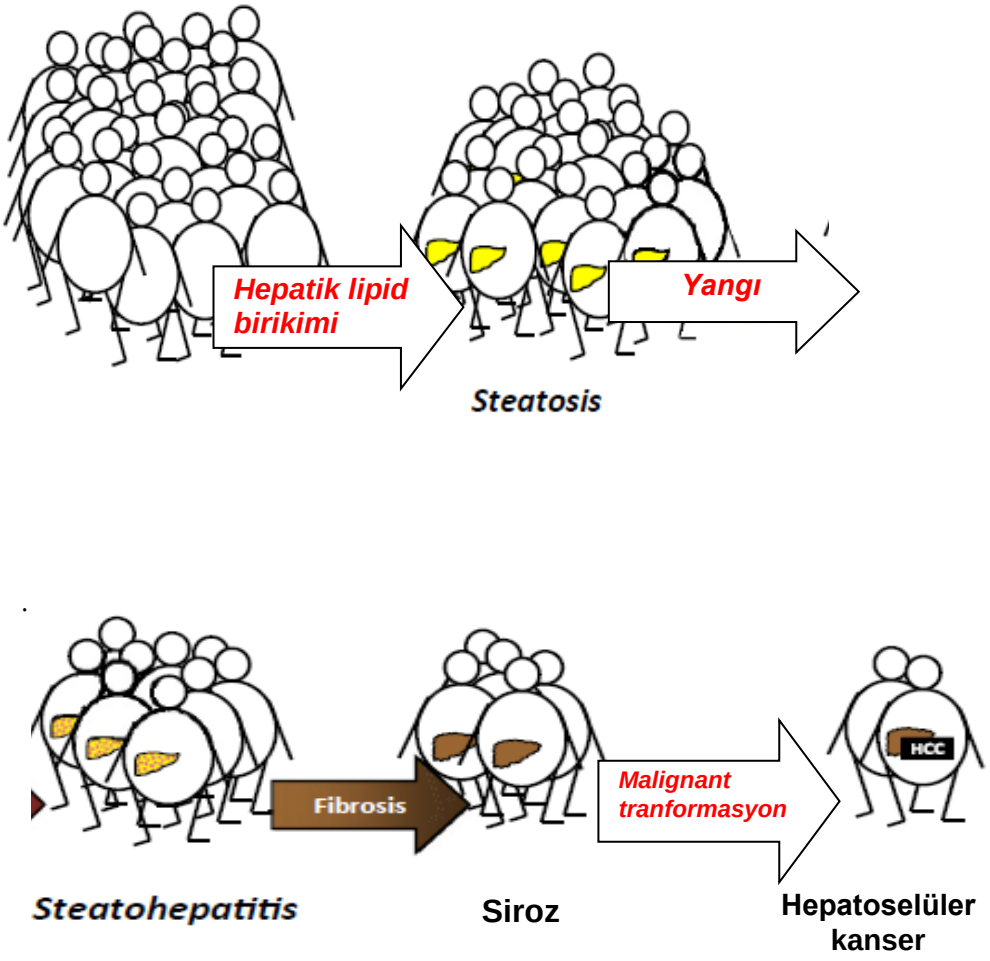
Obezite, başta gelişmiş ülkeler olmak üzere tüm dünyada prevalansı giderek artan bir sağlık sorunu olup, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından vücut kompozisyonunda insan sağlığını olumsuz şekilde etkileyecek düzeyde yağ miktarının artması olarak tanımlanmıştır. Obezitenin tanısı ve derecelendirilmesinde vücut kitle indeksi adı verilen parametre bir kriter olarak kullanılır. VKİ yani Vücut Kitle İndeksi, vücut ağırlığının (kg cinsinden), boyun (metre cinsinden) karesine bölünmesi ile hesaplanır.

Obezite, tip 2 Diabetes mellitus, hipertansiyon, dislipidemi, kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olup bunların morbidite ve mortalitesi yüksektir. Obezitenin, henüz hiçbir hastalıkla birlikteliği yokken tanınması ve tedavi edilmesi koruyucu sağlık politikalarının başında yer almaktadır (Akbulut ve ark 2007).

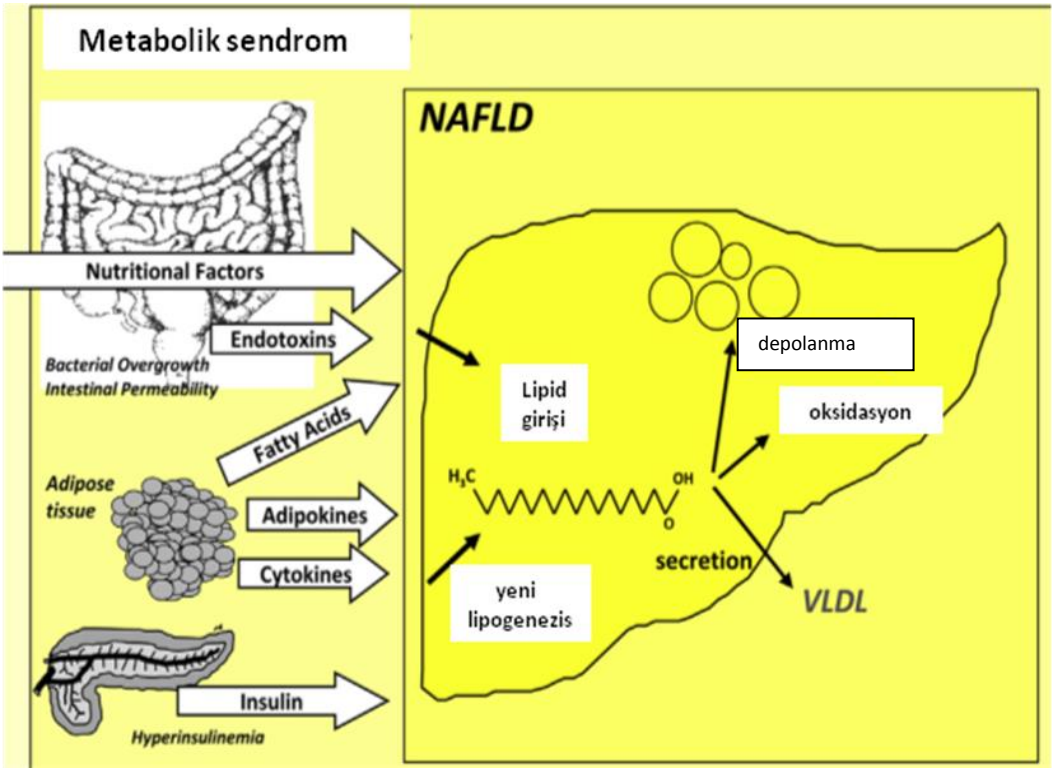
Alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalığı (NAFLD) hastalığı, insanlarda yaygın olarak obezite ile ilişkili ve yüksek prevalansa sahip karaciğer hastalığı olup halk sağlığını ciddi şekilde tehdit eder. Primer karaciğer yağlanması çoğunlukla obezite, insüline rezistansı (IR), metabolik sendrom, diabetes ve dislipidemi ile birlikte seyreder (Şekil 1.2). Primer karaciğer yağlanması metabolik sendromun hepatik bir görüntüsü olarak kabul edilir (Takahashi ve ark 2014). Obezite primer karaciğer yağlanmasının gelişiminde önemli bir risk faktörüdür (Sattar ve ark 2014). Sekonder karaciğer yağlanması ise viral enfeksiyonlar, otoimmun ve kalıtsal hastalıklar, toksinler, ilaçlar ve beslenme (parenteral beslenme, vitamin B_{12}/folik asit eksikliği, vs) ile ilgili her tür karaciğer hasarını yansıtır. Prevalansı, bütün dünya nüfusuna göre %15-45 arasında olup insidansı da hala artmaktadır (Dietrich ve Hellerbrand 2014, Tirosh 2014).

Çoğu primer karaciğer yağlanmalı hastalarda basit steatozis de görülmekle-birlikte hastaların 1/3'ünden fazlasında şiddetli alkolik olmayan steatohepatitis (NASH) gelişir. NASH, karaciğer yangısı ve hasarı ile karakterizedir ve karaciğer fibrozisi ve kanseri riski taşır. Hastalıkta karaciğer, sadece pasif bir hedef değil, aynı

zamanda metabolik sendromun patogenezisini ve onun komplikasyonlarını da etkiler. Tersine, adipoz doku ve intestinal bariyer veya immun sistem gibi diğer dokulardaki fizyopatolojik değişiklikler de primer karaciğer yağlanmasının ilerlemesini tetikler ve artırır (Dietrich ve Hellerbrand 2014) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Non alkolik karaciğer yağlanmasının doğal süreci (Dietrich ve Hellerbrand 2014).



Şekil 1.2. Primer karaciğer yağlanması metabolik sendromla ilgili çok sayıda mekanizmadan etkilenir. Hepatik steatozisin gelişiminde ve NASH'ya ilerlemesinde çok faktörlü mekanizmalar ve etkileşimler yer alır. (Dietrich ve Hellerbrand 2014).

Bireysel primer karaciğer yağlanması ilaç kullanımına, hayat tarzına ve çoğu defa metabolik sendroma (obezite, dislipidemi, hipertansiyon, hipertrigliseridemi ve tip 2 diyabet) bağlıdır. Diyetteki besin maddeleri primer karaciğer yağlanması ve ileri formların gelişiminde önemlidir. Genellikle yüksek doymuş yağ asidi ve kolesterol içeren yüksek enerjili diyetler, karaciğerde lipid birikiminin stimülasyonunu artırdığı ve patolojik tablonun NASH'ye ilerlemesini sağladığı sanılmaktadır (Vinaixa ve ark 2010, Fan ve Cao 2013). Doymuş yağ asitleri bakımından zengin diyetler yüksek plazma kolesterol konsantrasyonlarına ve kardiyovasküler hastalık riskinde artışa neden olur. İnsanlarda yemek sonrası lipoprotein profilinde önemli değişikliklerin şekillendiği ve bu değişikliklerin cinsiyet ve abdominal obeziteye bağlı olduğu tespit edilmiştir (Sabaka ve ark 2013).

Karaciğer yağlanmasının ve NASH'nin patogenezinde, henüz tam olarak açıklanamasa da iki teoriden oluşan popüler bir mekanizmadan bahsedilmektedir. Bu teorilerden biri karaciğerde çeşitli nedenlerle oluşan yağ birikimi, diğeri ise yine çeşitli nedenlerle oluşan oksidatif stresle bu yağ asitlerinin peroksidasyonudur (Tirosh

2014). Kronik obezite/tip 2 diyabete bağlı karaciğer yağlanmasının patogenezinde, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlıdır. Başlangıçta oluşan cevap ve metabolik değişikliklerle ilgili reaktif oksijen/nitrojen türlerinde üretim artışı mitokondriyal genom ve proteomlarda değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler mitokondriyal respirasyon kaybına, bu da yeterli ATP konsantrasyonlarının sürdürülmemesine yol açmaktadır. Bu olaylarda oksidatif stresin rolü birçok deneysel modelde gösterilmiştir. Bu yüzden, şimdiki ve gelecek araştırmaların amacı karaciğer yağlanmasının patogenezisi kapsamında moleküler mekanizmaların tam bir karakterizasyonuna yönelik olmalıdır. Reaktif oksijen/nitrojen türleri ile ilişkili etkilerin tam anlaşılması tedavide yeni mitokondriyumu hedefleyen moleküler ilaçların gelişimini kolaylaştıracaktır. Glikoz intoleransı, hiperglisemi, hiperinsülinemi, aterojenik dislipidemi, kardiyovasküler hastalıklar, böbrek hastalığı, karaciğer yağlanması ve osteoporozisi kapsayan geniş dağılımlı metabolik anormalliklerin temel nedeni IR'dir (Schimid ve ark 2011). Viseral obezite, insülin rezistansına yol açan, makrofaj aktivasyonu ve yangısal sitokin üretimi ile karakterize düşük dereceli genel bir kronik yangısal durum ile birliktedir. Adipoz dokudaki M1 (Proenflamator makrofajlar) ile M2 (Antienflamator makrofajlar) fenotipleri arasındaki denge, obezite ile ilgili IR ve hastalıkların gelişiminde çok önemli gibi görünmektedir. Son zamanlarda PPAR'lar, M1/M2 fenotipin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Fuentes ve ark 2010). Adipoz doku makrofajları yangısal olup lokal ve sistemik IR'ni artırırlar. Dünyada obezite giderek yaygınlaşmakta ve bu makrofajların metabolik hastalıklara nasıl katkıda bulunduğunu anlamak daha çok ilgi çekmektedir (Anderson ve ark 2010). Obezite, dislipidemi ile ilişkili olup, hepatik yağ asitlerinin aşırı birikimi, mitokondride β-oksidasyonun azalması, peroksizomal β-oksidasyon ve PPAR'lar aracılığı ile yağ asitlerinin mikrozomal ω-oksidasyonun artmasına bağlıdır (Hardwick ve ark 2009, Xie ve ark 2010). Çoklu doymamış yağ asitleri PPAR'lar, SREBP (Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein) ve karaciğer X reseptör gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu düzenleyerek etki gösterirler (Vallim ve Salter 2010).

Önlem ve tedavi ile ilgi olarak, diyetteki besin maddelerinin etkileri önemli olup primer karaciğer yağlanması ve birçok metabolik hastalığın tedavisine yardımcı olduğu belirtilmektedir. Primer karaciğer yağlanması ve NASH, besin maddelerinin aşırı alımının engellenmesiyle birlikte daha iyi bir beslenme terapisi ile önlenebilir

(Yasutake ve ark 2012, Garcia Caraballo ve ark 2013). Böyle hastaların beslenme rejimlerine soya proteini ve peynir altı suyunu artırarak tekli doymamış yağ asitleri (MUFA), omega-3 yağ asitleri ve probiyotikler ilave edilerek total kalori alınımı azaltılır (Fan ve Cao 2013). Yüksek proteinli diyet, VLDL (Çok düşük dansiteli lipoprotein) partiküllerinin lipid sekresyonunu artırarak primer karaciğer yağlanmasının gelişimini önlediği bildirilmektedir (Schwarz ve ark 2012). Günümüzde primer karaciğer yağlanmalı hastalarda siroz ve karaciğer kanseri gibi komplikasyonlarına karşı etkili bir tedavi olmamakla birlikte anti-TNF (Tümör nekrozis faktör), PPAR-α ve γ agonistleri, insülin duyarlılığını artıran (metformin ve tiazolidinedionlar) preperatlar, genel ve mitokondriyal hedefli antioksidanlar, S-adenozil metionin ve betain önerilmektedir (Tailleux ve ark 2012, Terashima ve ark 2014). Alkolik hepatit tedavisinde ise kortikosteroidler, pentoksifilin, propiltiourasil, ve anti-TNF-α kısmen başarılıdır. Karaciğer yağlanmasının tedavisinde metformin ve tiazolidinedionlar gibi insülin duyarlılığını artıran ilaçlar etkili olmaktadır. PPAR-γ agonistleri olan rosiglitazon ve pioglitazon gibi preparatlar, insulin rezistansını, TNF-α seviyelerini ve yangıyı azaltmaktadır. Yine PPAR-γ agonisti pioglitazon da trigliserid sentezini azaltan c-Met sinyal yolu ile etkileşerek alkole bağlı karaciğer hasarını önlemektedir. Bununla birlikte PPAR-γ ile aktive edilen spesifik moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılmamıştır. PPAR-α agonisti WY14,643, alkole bağlı karaciğer yağlanmasını β-oksidasyon aktivasyonu ile önlemektedir. Günümüzde, PPAR agonistlerinin klinik faydalarını değerlendirmek için uzun süreli ve çok kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır (Tailleux ve ark 2012, Cecille ve ark 2013). Bu ilaçlar kullanılırken dikkatli olunmalıdır, çünkü rosiglitazonla tedavide mitokondriyal anormallikler gözlenmiştir. Vitamin E'den başka N-acetylcysteine, çinko, silymarin ve ursodeoksikolik asit gibi antioksidanlar da karaciğer yağlanmasının tedavisinde etkilidirler (Li ve Chiang 2009, Wierzbicki ve 2009, Collino ve ark 2010, Nunes ve ark 2011). Kardiyovasküler damar hastalıkları tedavisinin köşe taşı kabul edilen statinler, karaciğer yağlanmasında da karaciğer biyokimyasının ve histolojisinin iyileşmesinde etkili bulunmuştur (Torish 2014).

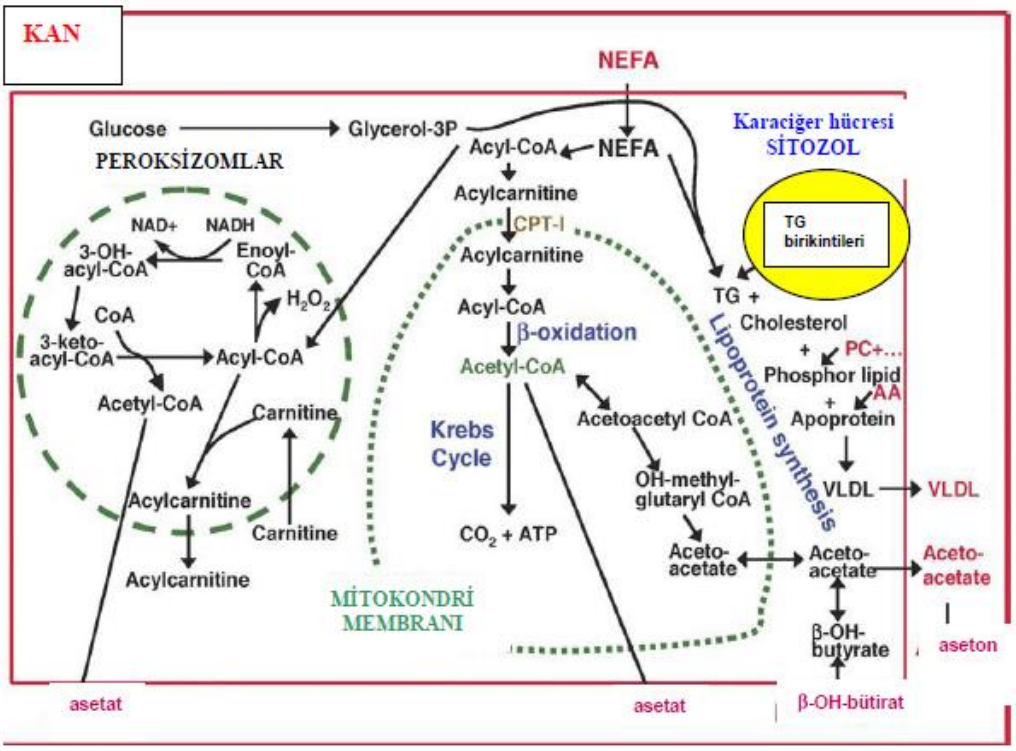
1.1.2. Evcil Hayvanlarda

Gelişmiş ülkelerde kedi ve köpeklerdeki obezite oranı en az %20 dir. Her iki türde de birçok hastalık obeziteyle ilgilidir. Kedi ve köpeklerde obezite tedavisi

önemli bir sorun olabilmektedir (Diez ve Nguyen 2006). Köpeklerde doğal obezite vakalarında sınırlı bilgi vardır ve çoğu bilgi de deneysel çalışmalardan elde edilmiştir (German 2006).

Yüksek verimli sütçü sığırlarda insidansı ve prevalansı yüksek bir metabolik hastalık olan karaciğer yağlanması, özellikle periparturient dönemi etkilemekte ve erken laktasyon döneminde ketozis, abomasum deplasmanı, parturient paresis, retensiyo sekondinarum, metritis, immun cevabın ve fertilitenin azalması gibi komplikasyonlara sıkça yol açmaktadır (Sevinç ve ark 2001, 2002, 2003 ve 2004, Başoğlu ve ark 2001, Ingvartsen 2006) (Şekil 1.3).

Gebelikten laktasyona geçiş, önemli metabolik adaptasyonlara sahne olur. Bu dönemde karbonhidrat ve lipid metabolizmasında da ciddi değişimler gözlenir. Ruminantlarda, pozitif enerji balansı sırasında temel glikoneojenik substrat propiyonattır. Oysa negatif enerji balansı sırasında öncelikle yağlar ve sonra da alanin, glikojenik substrattır. Non-ruminantlarda glikoneogenezis yolu, transkripsiyonel ve post transkripsiyonel düzeyde glukagon, insülin ve büyüme hormonu gibi hormonlarla sıkı sıkıya düzenlenmiştir. Mitokondriyal pirüvat karboksilaz (PC) ve sitosolik fosfoenol pirüvat karboksikinaz 1 (PCK1) enzimleri glikoneogenezis kontrolünde anahtar rol oynarlar. Fakat propiyonat metabolizması ve aktivasyonuna katılan diğer enzimler (propionil CoA karboksilaz, alfa polipeptid ve metilmalonil-CoA mutaz) ya da piruvat oksidasyonu kontrolünde yer alan enzimler (pirüvat dehidro kinaz, izozim 4 ve pirüvat dehidrogenaz alfa 1) tüm proseslerde önemlidirler (Khan ve ark 2014).



Şekil 1.3. Sütçü sığırlarda karaciğer yağlanmasının ve fibrozisinin patojenik mekanizmaları. Adipoz dokuda yüksek oranda TNF-α üretimi insülin rezistansına neden olur. Yüksek serbest yağ asitleri (NEFA) ve keton konsantrasyonları, hepatositlerde cytochrome P450 2E1 enzimi indüksiyonu için başlıca uyarı oluşturur. Oksidatif stres, hepatosit nekrozisinin ve hepatik yıldız hücrelerinin aktivasyonunun (karaciğer fibrozisinden sorumludurlar) sonucu ile birlikte karaciğer yağlanmasında sentral bir mekanizmadır. Bağırsak kaynaklı endotoksinlerin bir sonucu olarak Kuppfer hücrelerinin aktivasyonu karaciğer yangısına yol açar (HYH: Hepatik yıldız hücreleri, KH: Kuppfer hücreleri) (Ingvarsten 2006).

Karaciğer yağlanmasının önlenmesi ve tedavisi üzerine sürü idaresi stratejilerinin etkileri önemli oranda bilinmemektedir. Sütçü sığırlarda karaciğer yağlanmasını önleyici yaklaşımlar yağ dokularından yağ asit mobilizasyonunun inhibisyonunu ve yağ asit oksidasyonunu veya VLDL şeklinde uzaklaştırılmasını artırmayı kapsamaktadır. Adipoz dokudan lipolizi sınırlayan bileşikler olarak propilen glikol, monensin, krom, niasin ve konjuge linoleik asit sayılabilir. Gıdalara propilen glikol ve rumenden korunmuş kolin ilavesi, karaciğer yağlanmasına karşı koruyucu olabilmektedir. Kolin, karaciğerden yağ asitlerinin VLDL olarak çıkışını kolaylaştırırken propilen glikol, lipolizi engeller. Farklı etki şekilleri nedeniyle bu ikisinin ilave edilmesi iyi sonuçlar doğurabilir (Grummer 2008). Sütçü sığırlarda doğuma yakın reaktif oksijen metabolitlerinin üretimi artmaktadır. Bu dönemde bazı iz elementler ve vitaminler antioksidanların uygun bir dengede korunmasını sağlamaktadır. Anahtar antioksidan bileşikleri olan veya fonksiyonu yapan faydalı iz

elementler bakır, selenyum, çinko ve kromdur. Ayrıca, vitamin E ve karoten, faydalı antioksidan özelliklere sahiptir (Mulligan ve Doherty 2008). Başoğlu ve ark (2002), sütçü sığırlarda yemlere kuru dönemden itibaren bor ilavesinin karaciğer yağlanmasını önlediğini belirtmektedirler.

1.2. Metabolomikler

Belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda lipidler, karbohidratlar, vitaminler, hormonlar ve diğer hücre bileşenlerinden ortaya çıkan metabolitlerin çalışılmasına metabolomik denir. Metabolomikler *'omik'* kaskadı içerisinde son aşama olarak görülmektedir. Organizmanın genetik değişiklik, hastalık ve çevresel değişikliklere verdiği en son yanıt metabolomdaki değişikliklerdir. Proteomikte olduğu gibi hastalıkta belirleyici olan veya tedavide gözlem sağlayan metabolitlerin belirlenmesi amaçlanır. Hastanın metabolik profili ve genetik yapısına göre diyet önerilerinde bulunulmasına olanak verir. Genomik ve proteomik 'ne olabileceğinin' metabolomik ise 'gerçekte ne olduğunun' bilgisini verir. Bu nedenle, tüm metabolitlerin ayrıntılı ve kantitatif ölçümü (metabolomik) hastalık teşhisi veya toksik ajanların fenotip üzerindeki etkilerini araştırmada en ideal yöntemdir. Diyabette kan şekeri, koroner kalp hastalığında kolesterol düzeyi gibi geleneksel metabolitler, hastalık teşhisinde yıllardır kullanılmaktadır. Metabolomikler ise, içinde bulunulan duruma göre tüm metabolitlerdeki artma ve azalmaları belirlemeye çalışır. Kolesterol artışı ile koroner sorunların yaşanabileceği söylenebilir, fakat metabolomiklerle bu sorunun neden yaşanabileceği de bilinebilir. Yani metabolomik analiz ile sadece bilgi sunulmaz, aynı zamanda mekanizmalar daha kolay izah edilir (Coşkun 2007).

Nükleer manyetik rezonans (NMR), atom çekirdeklerinin manyetik özelliklerine bağlı bir fiziksel olgudur. Tek sayılı nükleon içeren tüm çekirdekler ve çift sayılı olan bazı diğer çekirdeklerin bir manyetik momenti vardır. En yaygın kullanılan çekirdekler hidrojen-1 ve karbon-13'tür. Ancak çoğu başka elementlerin de bazı izotopları gözlemlenebilir (^{1}H, ^{11}B, ^{13}C, ^{15}N, ^{31}P, ^{19}F vb. NMR). NMR, bir manyetik çekirdeği incelemek için onun manyetik momentini dışardan uygulanan kuvvetli bir manyetik alan ile aynı doğrultuya sokar, sonra momentlerin yönlenmesi bir elektromanyetik dalganın etkisi ile bozulur (Wikipedia 2008). Moleküllerin yapıları hakkında bilgi veren spektroskopik yöntemler içerisinde tartışmasız en ileri

seviyede olanı NMR spektroskopisidir. NMR spektroskopisi, molekül yapısının yanı sıra, moleküllerin çeşitli fiziksel özellikleri (bağ ve açı değerleri, gerilim, molekül içi dinamik dengeler, elektron ayrılması ve kinetik veriler) hakkında önemli bilgiler veren ve kimya biliminde önemli spektrometrik bir yöntemdir Balcı 2004). ^{1}H NMR spektroskopi teknikleri, bütün vücut sıvılarında ve ayrıca çeşitli dokularda daha hızlı ve güvenilir sonuç vermektedir. Bu teknik biyokimyasal analizlerde gün geçtikçe artan bir şekilde kullanılmaktadır (Ala-Korpela 2007). Son zamanlarda NMR ile metabolomikler, 1 μM kadar düşük konsantrasyonlardaki metabolitlerin yarı otomatik idantifikasyonu ve kantifikasyonunu sağlamaktadır. Bu da bazı vücut sıvılarında 20 farklı metabolitin (in vivo) ve bazı dokularda 100 metabolitin (in vitro) belirlenebileceği anlamına gelmektedir (Zhang ve ark 2012). ^{1}H NMR spektroskopisi, karaciğerde yağ miktarının belirlenmesinde uygun bir metot olmakla birlikte karaciğer yağlanmasında yangı veya fibrozisi belirlemek için yeterli değildir (Schreuder ve ark 2008). Obez Zucker ratlarda, kan ve karaciğer dokusu NMR analizleri ile, hepatik enerji durumunda bir azalma ile sonuçlanan metionin metabolizması ve mitokondriyal fonksiyonda spesifik metabolik anormallikler belirlenmiş, obezite ve karaciğer yağlanmasında hücre metabolizmasının anlaşılmasına önemli ışık tutabileceği belirtilmiştir (Serkova ve ark 2006).

Halk sağlığını koruma stratejileri üzerine önemli etkileri olan metabolomikler, bir araç olup obezite ve tip 2 diyabet ve insüline rezistans gibi ortak hastalıkların mekanizmalarını anlamada önemli bilgiler sağlamaktadır (Rauschert ve ark 2014). Tip 2 diabetli hastalarda, rosiglitazon etkilerinin anlaşılabilmesi için idrar ve plazma örneklerinde erken göstergeler olarak kabul edilen metabolomiklerin ^{1}H NMR spektroskopisiyle analizleri yapılmıştır (van Doorn ve ark 2007). Diyetle indüklenen insülin resistansının belirlemesinde de NMR spektroskopisi yardımcı bir metot olarak kullanılabilmektedir (Shearer ve ark 2008). Diabetli insanlarda NMR analizi ile lipoprotein profil belirlenmekle birlikte bu, geleneksel trigliserid ötesinde diabet öngörüsü sağlamamıştır (Hodge ve ark 2009, 2011). Ratlarda yüksek yağ diyeti ile oluşturulan karaciğer yağlanmasında karaciğerde çok daha fazla tetradekanoik asit, hegzadekanoik asit ve oleik asit ile daha düşük serbest yağ asitleri, araşidonik asit ve eikosapentaenoik asit bulunmuştur (Xie ve ark 2010). Metabolomik analiz ile primer karaciğer yağlanmalı hastalarda glikokolat, taurokolat

ve glikojenodeoksikolat seviyelerinin önemli oranda daha yüksek; NASH'li hastalarda uzun zincirli yağ asitlerinin daha düşük iken serbest karnitin, butirilkarnitin ve metilbutirilkarnitin konsantrasyonlarının daha yüksek; NASH ve steotozisli hastalarda birkaç glutamil dipeptidin daha yüksek iken sistein-glutasyon seviyelerinin daha düşük olduğu belirtilmiştir (Kalhan ve ark 2011). VLDL'nin hepatik lipaz tarafından hidrolizi ile PPAR-δ'nın transkripyonel cevapları düzenlenmektedir (Brown ve ark 2011). Viseral yağ ve IR'den bağımsız olarak karaciğerde yağ birikiminde, büyük VLDL partikülleri güçlü ve bağımsız bir markırdır (D'Adamo ve ark 2010).

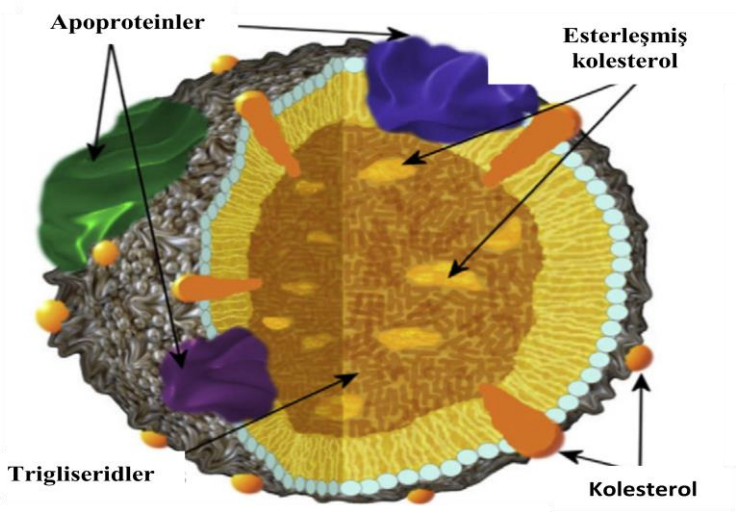
1.3. Lipoproteinler ve Lipoprotein Metabolizması

Lipidler, hayat için anahtar moleküllerdir. Örneğin, triasilgliseroller metabolik işlemler için enerji sağlar ve yağ asitleri, kolesterol ve fosfolipidler hormon moleküllerinin prekürsörleridir ve hücre membranlarının parçaları olarak santral sinir sistemi ve genetik sinyal modülatörlerin yapı taşlarıdır. Bununla birlikte, onların hidrofobik kimyasal yapısı, onları kan gibi sıvı bir ortamda uyuşmaz kılar. Lipidlerin kanda dolaşması ve perifer dokulara ulaşması için protein molekülleri ile birlikte makromoleküler bileşiklere (lipoproteinlere) paketlenir. Lipoprotein moleküllerinin genel yapısı küresel olup karaciğer ve bağırsaklarda sentez edilir. Non-polar lipidler (triasilgliseroller ve kolesterol esterler) vücut içinde bulunurken, polar lipidler (fosfolipidler ve serbest kolesterol) tek kat yüzeye dağılır (Savorani ve ark 2010) (Şekil 1.4).

Lipoproteinlerin protein kısımlarına apolipoproteinler (apoproteinler) denir. Bunlar, büyük yapısal çeşitlilikte bir grup protein olup polar lipidler ile birlikte yüzeyde bulunur. Bunlar, karaciğer ve perifer dokularda farklı enzimler ve reseptör moleküllerle nasıl ilişki kurulacağına kadar, lipoprotein sınıfının yapısı, metabolizması ve fonksiyonunu belirlerler. Apolipoprotein A-I (ApoA-I), HDL (Yüksek dansiteli lipoprotein)'nin başlıca yapısal komponentidir ve şekilsel adaptasyon yeteneği nedeniyle tüm HDL alt sınıflarını stabilize edebilir (Pirillo ve ark 2013). Lipoproteinler, dansitelerine göre tanımlanır ve 5 ana sınıfa ayrılır: şilomikronlar, VLDL, IDL (Orta dansiteli lipoprotein), LDL (Düşük dansiteli lipoprotein) ve HDL. İyi kolesterol olarak bilinen HDL metabolizması Şekil 1.5'te izah edilmektedir. Bu lipoprotein sınıflarının herbiri de birkaç alt sınıfa ayrılabilir. Lipoprotein lipid seviyeleri ile lipoprotein

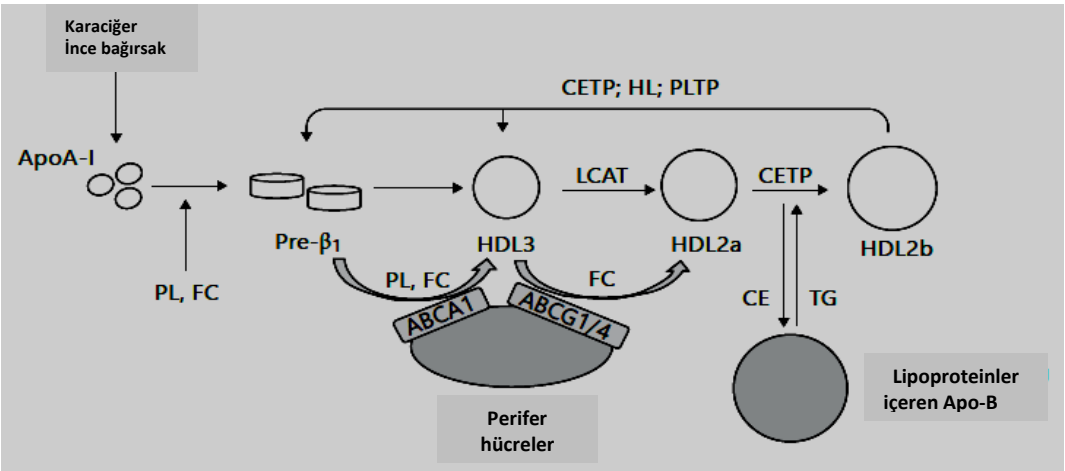
partikül sayılarının arasındaki ayrım, potansiyel olarak klinik yönden önemlidir. Çünkü, iki ölçüm aynı şey değildir. Örneğin, aynı LDL kolesterol konsantrasyonuna sahip iki hastada, farklı sayıda LDL partikülü bulunabilir ve bu yüzden iki hastanın kardiyovasküler riskleri de farklıdır (Jeyarajah ve ark 2006, Philips 2012).

Diyabetli şahıslarda HDL konsantrasyonu düşük ve trigiliserit konsantrasyonu ise yüksek olup aynı zamanda küçük, yoğun LDL'ler ağır basar. Küçük HDL partikülleri hızla katabolize edilerek düşük HDL kolesterol seviyelerine katkıda bulunurlar. Üstelik, küçük yoğun LDL'ler, diyabet dahil çoğu hipertrigliseridemik durumda mevcutturlar. Bunlar daha kolay okside edilir, partiküller LDL reseptörleri ile ilişki kurmazken hücrelerin yüzeyinde veya matrikste proteoglikanlarla daha kolay bağlanabilirler. Bu yüzden, düşük HDL ve yüksek trigliserid seviyeleri ile birlikte LDL'lerin diyabetik dislipidemide önemli rolü vardır. Lipoprotein alt sınıflarına yönelik bir başka çalışmada karaciğer yağlanmasının, büyük VLDL ve küçük yoğun LDL ile düşük büyük HDL konsantrasyonları ile karakterize belirgin dislipidemik profille ilgili olduğu belirtilmiştir (Cali ve ark 2007). Küçük, yoğun LDL partikülleri kardiyovasküler risk faktörü olarak dikkate alınır. Karmaşık dislipidemili obez hastalarda çoğu defa bu tip LDL seviyeleri yüksektir (Florentin ve ark 2010). NASH'de karaciğer trigliserid ve kolesterol sentezi artarken aynı zamanda VLDL sentezi de artar. Karaciğerde yüksek kolesterol miktarı da NASH ile ilişkilidir. Ayrıca LDL ve VLDL alt sınıflarından (HDL alt sınıflarından değil) oluşan total lipid konsantrasyonu da NASH ile ilişkilidir (Männistö ve ark 2014).



Şekil 1.4. Tipik bir lipoproteinin şematik diyagramı (Savorani ve ark 2010).

İnsanlarda kardiovasküler kalp hastalığı, diyabetli hastaların başlıca ölüm nedenidir. Diabetik hastalar kardiyovasküler olanlardan 2-4 defa daha fazla görülür. Plazma HDL seviyeleri ile kardiyovasküler hastalıklar arasında negatif korelasyon olduğu vurgulanmakta ise de sadece plazma HDL seviyelerinin ölçümüne göre HDL fonksiyonun değerlendirilmesi daha önemlidir. Dislipidemik durumlarda dolaşımdaki büyük HDL partikülleri azalırken, koroner kalp hastalığına sahip hastalarda ise küçük yoğunluklu HDL partikülleri artmaktadır (Pirillo ve ark 2013, Akinkuolie ve ark 2014). Üstelik, dislipidemi gelişimi diyabetin bir prokürsörü olabilir. Aynı zamanda, standart lipid paneli ile karşılaştırıldığında LDL ve HDL alt sınıflarının kardiyovasküler risk öngürüsü için kullanılıp kullanılamayacağı konusu tartışmalıdır. LDL partikül büyüklüğü ile kardiovasküler risk arasında ilişkinin kalıtsal olmamakla birlikte daha küçük partiküllerin bu tip LDL'nin partikül sayısında artışa neden olduğu ifade edilmektedir. Özet olarak, ileri lipoprotein testlerin henüz rutin klinik kullanımı yoksa da tam bir lipoprotein alt sınıf kompozisyonu, büyüklüğü ve fonksiyon analizine ihtiyaç vardır (Mallol ve ark 2013).



Şekil 1.5. HDL Metabolizması. Karaciğer ve ince bağırsaklar tarafından salınan Apo A-I, ön â-HDL'ler disk şeklinde oluşum için PL(fosfolipidler) ve FC(serbest kolesterol) ile birleşir. Uzun zincirli yağ asitleri, FC'yi kolesteril estere dönüştürür. Bu da disk şeklindeki HDL'yi küresel HDL'ye dönüştüren partiküle taşınır. CETP (kolesteril ester transferaz protein), HDL kolesterol esterin lipoproteinler içeren apoB'ye dönüşümünde etkilidir. Bu da TG dönüşümünde yer alır. HDL, hepatik lipaz tarafından da sindirilerek HDL PL ve TG (trigliserid) hidrolize olur ve daha küçük HDL'lere ve lipitten fakir apoA-I'ler meydana gelir. Bunlar siklusu tekrar başlatırlar. CETP ve fosfolipid transfer proteini büyük á-partiküllerinden küçük ön â 1 partikülleri oluşumuna katkıda bulunur. ABCA1 = ATP-binding cassette transporter A1; ABCG1/4 = ATP-binding cassette transporter G1/4 (Pirillo ve ark 2013).

1.4. Transkriptomikler ve Nükleer Hormon Reseptörleri

1.4.1. İnsanlarda

Transkriptomikler, hücre genomundan transkripsiyon yolu ile ortaya çıkan mRNA transkriptlerinin eş zamanlı incelemesidir. Transkriptomik, besin öğelerinin genom boyunca gen ekspresyonunu ne şekilde değiştirdiğini anlamamıza yardımcı olur. Ticari 'chip'ler geliştirerek ilgili genin ne gibi metabolik değişikliklere yol açabileceği kısa süre içinde öğrenilebilir ve hastalık mekanizmalarının anlaşılmasına imkan verir. Örneğin, yüksek glikoz konsantrasyonları ile birlikte olan mRNA profili bilinebilirse diyabette görülen diyabetik nefropati gibi vasküler komplikasyonların nasıl ortaya çıktığı anlaşılabilir. Besin öğeleri ve biyolojik olarak aktif besin bileşenlerinden global gen ekspresyonu ve transkriptomiki etkileyenler belirlenebilirse bunları önlemede etkin diyet yaklaşımları geliştirilebilir.

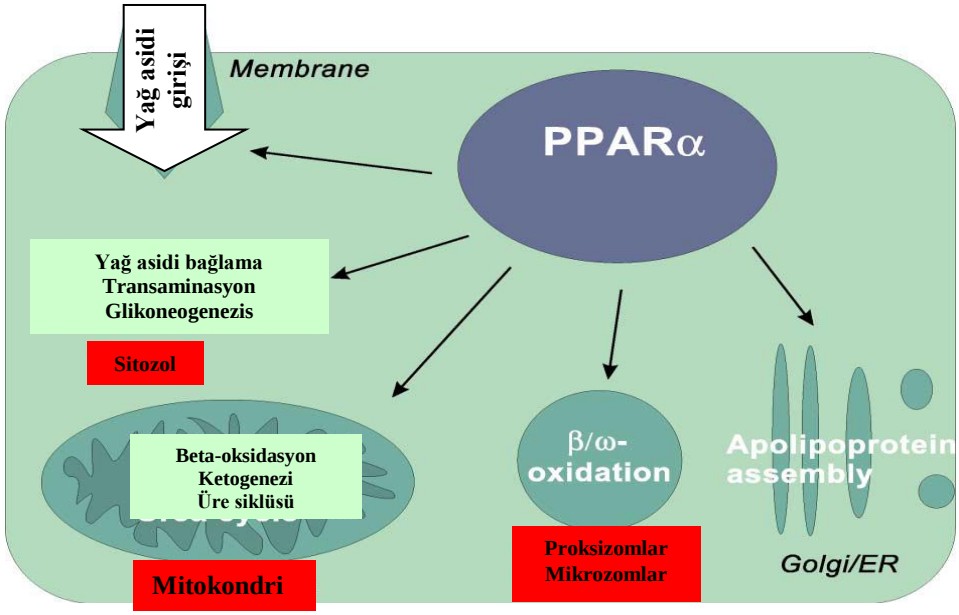
Transkriptomikte 'microarray' teknolojisi ile binlerce genin ekspresyon kalıbını bir seferde incelemek mümkündür. 'Chip' teknolojisi ile transkriptomik çalışmalar yeni diyet yanıtı belirteçlerin bulunmasına ve bu teknoloji ile yapılacak taramalar biyoaktivitesi yüksek, zararlı ve toksik etkileri en düşük besin bileşenlerini belirlememize yardımcı olur (Coşkun 2007).

Son yıllarda obezitenin prevalansının artması ile birlikte tip 2 diabetes, dislipidemia, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıkları kapsayan metabolik bozuklukların birlikteliği de artmıştır. Bu yüzden, bu bozuklukların önlenmesi ve tedavisinde yeni stratejilere ihtiyaç vardır. PPAR'lar, temel olarak enerji homeostazisinin regülasyonunda yer aldıkları için metabolik bozuklukların tedavisinde dikkat çekici ilaç hedefleri olarak dikkate alınmaktadırlar (Choi ve ark 2014).

PPAR-α ve PPAR-γ, karaciğerde yağ birikimi ve insülin rezistansı üzerine etkilidir (Kallwitz ve ark 2008). Bu ikisinin dışında, başka bir alt reseptör tipi olan PPAR-β/δ'nın en önemli görevi, kalp ve iskelet kaslarının enerji metabolizmalarında yağ asitlerinin kullanılma kapasitelerini artırmaktır. Bu iki alt tip reseptör, karaciğerden VLDL ve glikoz sekresyonunu inhibe eder. Bu etkiler, diyetle yüksek yağ alımı durumunda insülin duyarlılığının yanı sıra HDL, trigliserid ve serbest yağ asitlerinin normal seviyelerinin korunması için çok önemlidir. PPAR-α ise çoğunlukla adipoz

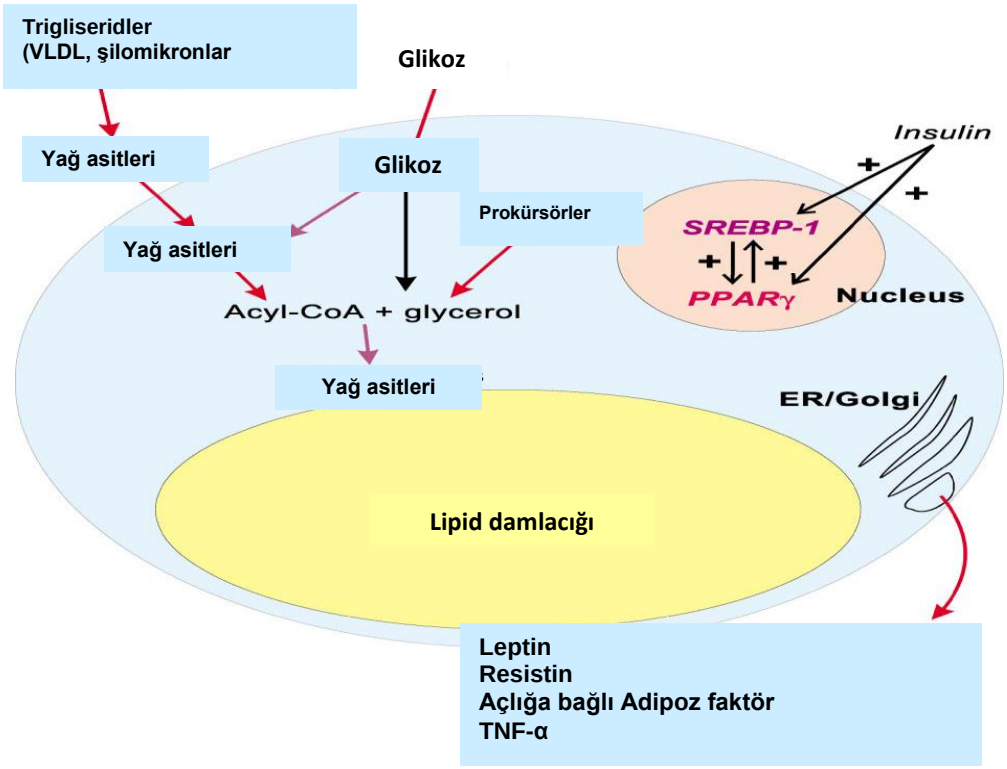
dokularda ve daha az olarak da kas, karaciğer ve makrofajlarda açığa çıkarak lipid birikimini artırmakta ve adipoz dokulardan yağ asidi sekresyonunu kısıtlamada önemli olup lipid kullanımını ve insülin duyarlılığını düzenlemektedir (Seedorf ve Aberle 2007, Alaynick 2008, Wierzbicki ve ark 2009) (Şekil 1.6).

Primer karaciğer yağlanmasının patogenezisinde nükleer hormon reseptörlerinin yer aldığı asıl mekanizmaların anlaşılması, yeni tedaviler geliştirmede önemli olabilir (Lopez ve ark 2012). Nükleer hormon reseptörleri olan PPAR-α, PPAR-β/δ ve PPAR-γ, yağ asitleri ve yağ asit metabolitlerini kapsayan çeşitli moleküller tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörler ailesidir. PPAR'lar enerji homeostazisi ve metabolizmasında çok önemli rol oynarlar ve metabolizma, yangı, proliferasyon ve farklı hücre tiplerinde diferensiyasyonda yer alan birçok genin transkripsiyonunu regüle ederler (Neels 2014, Choi 2014).



Şekil 1.6. Hepatositlerde yağ asidi metabolizmasının PPAR-α tarafından regülasyonu. Pozitif (yağ asidi metabolizması, glikoneogenezis) ve negatif (amino asit metabolizması) regülasyonlar (Kersten 2002).

PPAR-α enerji açığa çıkması, karaciğer yağlanması, lipoprotein sentezi, yangı ve karaciğer kanserini düzenleyen bir ksenobiotik ve lipid sensörü olarak hizmet eder (Pyper ve ark 2010). PPAR-α aktivasyonu trigliserid seviyesini düşürür ve enerji homeostasinin regülasyonunda yer alır. PPAR-γ aktivasyonu, insulin duyarlılığına neden olur ve glikoz metabolizmasını artırır, oysa PPAR-β/δ aktivasyonu yağ asitlerinin metabolizmasını artırır. Bu yüzden, PPAR nükleer reseptör ailesi enerji homeostazisi ve metabolik fonksiyonda önemli regülatör rol oynar (Kersten 2002) (Şekil 1.7).



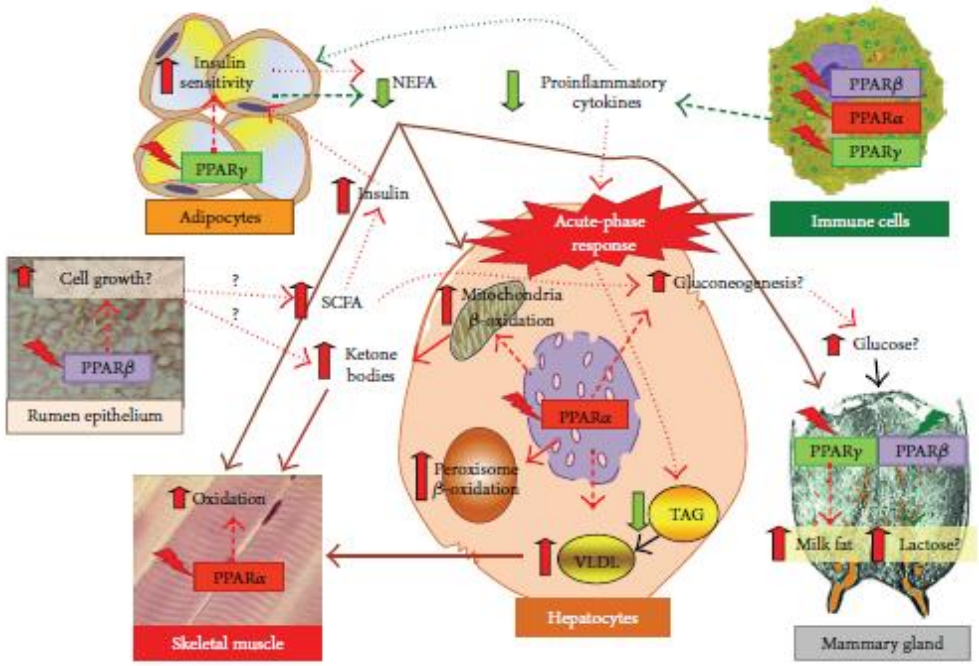
Şekil 1.7. Adipoz dokuda lipid metabolizmasının PPAR-γ ve SREBP-1 tarafından regülasyonu. Plazmadan trigliseridlerin ve glikozun alınarak yağ depolanmasındaki önemli adımlar. PPAR-γ tarafından stimüle edilen yollar kırmızı oklarla SREBP-1 tarafından stimüle edilen yollar da mor oklarla gösteriliyor. Insulin, PPAR-γ ve SREBP-1'in her ikisinin ekspresyonunu indükler. Tersine, SREBP-1 de PPAR-γ'nin ekspresyonunu stimüle eder (Kersten 2002).

Her ne kadar PPAR-β/δ ve PPAR-γ'nın aktivasyonu insülin duyarlılığının ve glikoz toleransının artışına neden olsa da PPAR-β/δ aktivasyonu PPAR-γ aktivasyonundan fonksiyonel olarak farklı olup hepatik ve periferal yağ asidi oksidasyonunun artışı ile karakterizedir. Bu da PPAR-γ ile kıyaslandığında bu reseptörün farklı bir katabolik rolünü gösterir (Roberts ve ark 2009).

Farnesoid X reseptör ve PPAR-*α* geniş bir lipolitik aktivite dizisini idare etmede yer alan ligandlarla aktive edilirler. Bunlar metabolik karaciğer bozuklukları için geleceğin aday ilaçları olabilir (Lopez ve ark 2012).

1.4.2. Sütçü Sığırlarda PPAR'lar ve Karaciğer Yağ Asidi Metabolizması

Non-ruminantlarda PPAR-α ağının aktivasyonu; uzun zincirli yağ asitlerinin hücresel alımı, aktivasyonu ve oksidasyonunu kapsayan lipid metabolizmasının koordinasyonuna yönelik beslenme periyotları sırasında önemlidir. Doğuma yakın yağ dokusundaki lipolizin, PPAR-α ve RXR-*α* (Retinoik asit reseptör) sinyalini aktive etmek için NEFA sağladığı ve bu yüzden hedef genlerin ekspresyonunu arttığı ifade edilmiştir. Doğuma yakın hepatik PPAR-α ekspresyonu göz önünde bulundurulduğunda, konu hakkında tutarlı raporlar olmamakla birlikte, PPAR ekspresyonunun kontrolünde, inflamasyon derecesi gibi başka faktörler de rol oynayabilir. Örneğin doğum sonu yangısal değişikliğin, PPAR-α'yı değiştirmediği fakat PPAR-β/δ'yı arttırdığı belirtilmiştir (Khan ve ark 2014) (Şekil 1.8). Palin ve Petit (2004) ve Carriqury ve ark (2009), sığırların doğumdan önce aşırı beslenmesinin, hatta onların diyetlerine uzun zincirli yağ asitleri eklense de PPAR-α'nın hepatik ekspresyonlarına etkisinin olmadığını ifade etmektedirler.



Şekil 1.8. PPAR ailesinin doğumdan hemen önce doğumdan sonraki 2 hafta boyunca aktive olması inflamasyon benzeri durumları azaltmalıdır. Bu durum, bir taraftan NEFA salınımının stimulasyonunu, diğer taraftan karaciğer akut faz reaksiyonunu (her ikisi proenflamatuvar sitokinler tarafından belirlenir) önleyerek gerçekleştirilir. Bu koordine reaksiyonlar dizisi gebelikten laktasyona daha yumuşak bir geçiş sağlayan ideal bir metabolik durum sağlamalıdır. Bu da normal fonksiyonları için karaciğere kendi kaynaklarını kullanmasına imkan verir. Bunun sonucu olarak, peripartum dönemdeki tipik hastalıkların insidansı azalır ve daha sağlıklı ve yüksek performanslı sığırlar ortaya çıkar. Düz kesik çizgili oklar PPAR ailesinin aktivasyon/inhibisyon beklenen etkisini göstermektedir ve eğri noktalı oklar PPAR ailesinin sekonder veya indirekt etkilerini ifade etmektedir. İki durumda kırmızı: aktivasyon veya artmayı ve yeşil: inhibisyon veya azalmayı ifade eder (Khan ve ark 2014).

1.5. Bor

Son yüzyılda, bilim ve teknolojideki gelişmelerle birlikte borun ileri teknolojilerde çok büyük avantajlar sağladığı ortaya konmuştur. Bor, özellikle ileri teknoloji ürünlerinde önemli teknolojik yeniliklerin yapılmasını ve geliştirilmesini sağlayan anahtar element rolünü üstlenmiştir. Bor cam, kimya ve deterjan, seramik ve polimerik malzemeler, metalurji ve inşaat, gıda ve tarım (ağaç koruyucu, insektisit, herbisit vb.) gibi alanlara ek olarak, uzay ve hava araçları, askeri araçlar, füzeler, radarlar, iletişim teknolojileri (cep telefonları, dizüstü bilgisayarlar vb.), otomotiv sanayi ve enerji olmak üzere sanayinin pek çok alanında yaygın kullanım alanı bulmuştur (Helvacı 2004, Aiello 2005).

Bitkiler için esansiyel olduğu kabul edilmiş, fakat insan ve hayvanlar için esansiyel oldukları yeni belirlenmiş iz elementlerden birisi olan bor üzerine bilimsel araştırmalar devam etmektedir. Bu iz element ile ilgili araştırmalar, çeşitli besinsel, metabolik, hormonal ve fizyolojik koşullarda biyolojik önem ve metabolizma üzerine etkileri ile ilgilidir. Bir mikromineral olan bor, insan ve hayvanlar tarafından günlük olarak alınmaktadır. Bunun yanı sıra şarap, bira ve kahve gibi içeceklerde de bulunmaktadır (Sabuncuoğlu ve ark 2006). İnsanlar tarafından meyve ve sebzelerden olmak üzere yiyecek ve içecekler yoluyla günde 10-20 mg bor vücuda alınabilmektedir. Su ve yiyeceklerle alınan bor, kısa sürede ve tamamen vücut tarafından emilmekte, ancak vücutta birikmeden idrar yoluyla atılmaktadır (Güler ve Çobanoğlu 1997). Bor, dinamik bir iz elementtir. İnorganik boratlar, düşük dozlarda, emilmeden önce mukozal yüzeylerde fizyolojik pH'larda borik aside dönüşür. İnsan ve hayvan çalışmalarında, boratın verilen dozunun %90'ından fazlası borik asit şeklinde atılır. In vitro ve in vivo sistemlerde, borik asidin *cis*-hidroksil gruplara affinitesi vardır ve bu borik asidin biyolojik etkilerini açıklayan mekanizma olabilir (WHO 1998, Bolanos ve ark 2004).

In vitro, hayvan ve insan deneyleri ile borun, beslenme miktarlarında kemik büyümesi, merkezi sinir sistemi fonksiyonu, artritik semptomların hafifletilmesi, hormon etkisinin kolaylaştırılması ve bazı tip kanser riskinin azaltılmasında faydalı olduğu ortaya konmuştur. Bu etkiler, cis-hidroksil grupları içeren biyomoleküllerde boroesterler oluşumu ile ilgilidir. Bu nedenle bor adenozin içeren veya adenozin prokürsörlerinden oluşan biyomolekülleri etkileyerek çeşitli yararları ortaya çıkmaktadır. Bu biyomoleküller, S-adenozilmethionin ve diadenozin fosfatlardır. Bunlardan S-adenosylmethionin, vücutta en sık kullanılan enzim substratlarından biridir. Diadenozin fosfatlar da sinyal nükleotidler olarak görev yapar. Bor ayrıca okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD+)'e güçlü bir şekilde bağlanarak ilgili reaksiyonları etkileyebilir (Nielsen 2014).

Bor kalsiyum, bakır, magnezyum, azot, glikoz, trigliseridler, reaktif oksijen ve östrojen dahil, hayati olaylarda yer alan çok sayıda maddenin metabolizmasını etkileyebilir. Bu etkileri ile vücutta kan, beyin, iskelet dâhil birçok sistemi iyi yönde etkileyebilir. Bu da göstermektedir ki, bor esansiyel bir element değilse de fizyolojik miktarlarda faydalı bir elementtir. Bor, hücre membran fonksiyonu, stabilitesi ve

yapısı üzerinde etkilidir. Borun makromineral metabolizmasına etkisiyle serum 25-hidroksi-kolekalsiferol seviyesi artarken kalsitonin seviyesinde artış olmaz. Enerji metabolizmasına etkisiyle serum glikoz seviyesi düşerken, trigliserid seviyesi artar. Azot metabolizmasına etkisiyle kan üre nitrojeni ve serum kreatinin seviyesi düşer, idrarla hidroksiprolin atılımı artar. Reaktif oksijen metabolizmasına etkisiyle serum süperoksit dismutaz ve serum seruloplazmin seviyeleri artar. Hematolojik etkileri ile ise hemoglobin ve MCHC (Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu) artarken hematokrit ile trombosit ve eritrosit sayıları düşer (WHO 1998).

Bor, bitki büyümesi için esansiyel bir element olup birkaç fizyolojik proses kapsamında bir dizi gende ekspresyon değişikliklerine neden olur (Camacho-Cruz-Cristóbal ve ark 2011). Özelikle borun hücre sinyal verici moleküllerle kompleks yapabilme kabiliyeti, onun spesifik biyokimyasal fonksiyonlarına ışık tutabilir (Hunt 2012). Borik asit, SLC4A2 ve SLC4A3'ün (insan anyon değiştirici genler) ekspresyon seviyelerini artırmaktadır (Akbas ve ark 2012). Borun ratlarda, hormonal ve lipid metabolizmasını etkilediği (Küçükkurt ve ark 2103) ve hepatoselüler kanser tedavisinde potansiyel rolü olduğuna dikkat çekilmektedir (Zafar ve Ali 2013).

Bor oksidatif stres parametrelerini değiştirerek karaciğer yetmezliğinde gözlenen zararlı etkileri dengelemekte ve karaciğeri kısmen normalleştirmektedir (Pawa ve Ali 2006). Nielsen (2009)'a göre bor, S-adenosilmetionin oluşumunu veya kullanımını etkileyerek biyoaktif etki göstermekte, bu yüzden, bor eksikliği ile oluşan etkilerin çoğu, bir substrat olarak S-adenosilmetionin kullanan enzim reaksiyonlarında bir değişikliğin sonucu olabilmektedir. Başoğlu ve ark (2000 ve 2002), borun insan ve hayvanlarda plazma lipid düşürücü olarak araştırmaya değer olduğunu; sütçü sığırlarda da lipid metabolizması, özellikle serum trigliserid konsantrasyonu ve karaciğerin VLDL sekresyonu üzerinde rol oynayabileceğini vurgulamaktadırlar. Başka araştırmalarında da yüksek bor dozlarının uzun süre ve 96 saat aralıkla tolere edilebildiğini; enerji durumunu iyileştirici, oksidatif stresi azaltıcı ve lipid profili değiştirici etkilerle karaciğer ve viseral yağ birikiminin önlenmesinde etkili olduğunu ifade etmişlerdir (Başoğlu ve ark 2010). Diğer bir çalışmada aynı araştırmacılar, (Başoğlu ve ark 2011) ilk defa yapılan borun etkinliğinin NMR bazlı değerlendirmesinde en dikkat çekici değişikliklerin alanin, metionin, pirüvik asit ve keratin gibi metabolitlerde olduğunu belirtmektedirler. Son zamanlarda bor içeren

küçük moleküller sentezlenmiştir. Bunlar arasında BF175, invitro MED15-KIX'in SREBP1a-TAD'ye bağlanmasını bloke ederek SREBP transkripsiyonel aktivitesinin inhibisyonuna ve SREBP hedef gen ekspresyonunun azalmasına yol açar. Üstelik BF175 diete bağlı fare modeli obezitede lipid homeostazisini iyileştirebilmektedir (Zhao ve ark 2014).

Yukarıda bahsedilen literatürlerden insanlarda obezite, karaciğer yağlanması ve steatohepatitis konusunda moleküler düzeyde *'omik'* çalışmaların daha kapsamlı, hayvanlarda ise bunların henüz emekleme aşamasında olduğu söylenebilir. Beşeri ve veteriner hekimlikte adı geçen bozukluklarda tartışmalı çok farklı tedavi yaklaşımları gözlenmektedir. Borun bunlara bir alternatif olup olamayacağına yönelik metabolik ve transkriptomik bazlı bu çalışmada ortaya konmuştur.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2. 1. Hayvanlar, Diyetler ve Bor Kullanımı

Projenin deney hayvanları uygulama aşaması Afyon Kocatepe Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde çalışıldı. Bu çalışmada aynı yaş grubunda (8 ay) 2,5-3,0 kg canlı ağırlığında, 40 (kırk) adet dişi Yeni Zelanda beyaz tavşanı kullanıldı. Hayvanlar ısı, ışık ve havalandırılması kontrol edilebilen kafeslerde 2 hafta süreyle standart diyetlerle beslendi. Bu hayvanlar daha sonra kiloları ve sayıları (n=10) eşit olacak şekilde dört gruba ayrıldı (Resim 2.1 ve 2.2). Kontrol grubu, yüksek proteinli ve enerjili diyet (ham protein: %18, metabolik enerji: 2800 en az kkal/kg, konsantre pelet yem) (CP 5701 Buzağı Başlangıç Yemi) (Çizelge 2.1) ile beslendi. Deneme gruplarındaki hayvanlar da yukarıda sözü edilen yüksek proteinli ve enerjili diyetle beslenirken, birinci deneme grubunun içme sularına sulu boraks, 30 mg/L dozunda; ikinci deneme grubunun içme sularına susuz boraks, 30 mg/L dozunda ve üçüncü deneme grubunun içme sularına borik asit, 30 mg/L dozunda ilave edildi. Çalışmadaki hayvanların tümüne deneme süresince (3 ay) diyet ve suları ad libidum olarak sağlandı. Deneme süresince vücut ağırlıkları aylık olarak, yem ve su tüketimleri de günlük, haftalık ve aylık olarak kaydedildi (Resim 2.2 ve 2.3).

Çalışma sonunda hayvanlardan venöz kan örnekleri alındı ve sakrifiye edilerek, viseral yağlanma (abdominal boşluk, mezenterium ve retroperitoneal sahadaki miktar) belirlendi ve karaciğer örnekleri her sol lobta aynı lokal yerden alındı. Karaciğer örnekleri sıvı azotta ön dondurmaya tabi tutuldu; tüm kan, serum, plazma karaciğer ve böbrek örnekleri analiz edilinceye kadar -20 °C ve -80 °C'de saklandı.

2. 2. Vücut Kütle İndeksi

Bir obezite markırı olarak VKİ (vücut kütle indeksi) = vücut ağırlığı (kg)/vücut uzunluğu (m) X vücut yüksekliği (m) formülü ile hesaplandı (Kawai ve ark 2006).

2. 3. Biyokimyasal Analizler

Plazma lipid profil (HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, Total-kolesterol ve Total-lipid, konsantrasyonları) ile glikoz ve insülin konsantrasyonları, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyon (LPO), antioksidan potansiyel (AOP) spektrometrik olarak ölçüldü.



Resim 2.1. Deneme hayvanlarının bireysel kafeslerde genel görünümü.



Resim 2.2. Bir kafesin yakından görünümü.



Resim 2.3. Tartım işlemleri.

Çizelge 2.1. Yüksek enerjili diyet içeriği.

Besin Maddesi	**%**	**Besin Maddesi**	**%**
Su, % (en çok)	12	A Vitamini, IU/kg (en az)	5. 000
Ham Protein, % (en az)	18	D3 Vitamini, IU/kg (en az)	600
Ham Selüloz, % (en çok)	12	E Vitamini, mg/kg (en az)	25
Ham Kül,% (en çok)	8	Fosfor % (en az)	0,5
HCl'de Çözünmeyen Kül, % (en çok)	1	Sodyum, % (en az-en çok)	0,1-0,4
NaCl, % (en çok)	0,60	Kalsiyum, % (en az-en çok)	1-2
Metabolik Enerji, (en az, kcal/kg)	2800		

2.4. NMR Analizleri:

NMR analizleri, Çek Cumhuriyeti Masarikova Üniversitesi Bio-NMR Merkezi'nde ölçülmüştür (Resim 2.4). Her örnek (300 µl) 300 ml sodium fosfat buffer (75 mM Na2HPO4 in % 80/% 20 H_2O/D_2O, pH 7.4; ayrıca % 0.08 sodium 3-(trimethylsilyl) propionate-2,2,3,3-d4 ve % 0. 04 sodium azid içeren) ile karıştırıldı. NMR spektra üç rezonanslı (^{1}H-^{13}C-^{15}N) 700 MHz'lik Bruker Avance Spektrometre'de ölçüldü (Resim 2. 4). Ölçümden önce her örnek oda ısısında (yaklaşık $22^{0}C$) bir saat bekletildi. Sonra örnek proba yerleştirildi ve 37°C'destabilize olması için 10 dakika bekletildi. Ölçümden önce prob, her örnek için otomatik olarak kalibre edildi. İki tip spektra elde edildi: LIPO (Lipoprotein Lipid) ve LMWM (Low molecular – weight metabolites). LIPO pencere için 3s relaksasyon gecikmeli, 10 ms karıştırma zamanlı ve 2.8s akizisyon zamanlı standard Bruker noesygpps1d pulse sequence kullanarak 1 boyutlu NOESY spektra ile ölçüm yapıldı. LMWM pencere için 3s relaksasyon gecikmeli, 403 µs sabit eko gecikmeli, 78 ms T_2 filtre ve 3.3s akizisyon zamanlı standard Bruker cpmgpr1d pulse sequence kullanarak T_2 relaksasyon filtreli spektra kullanılmıştır. Her iki tip spektrada su sinyali, relaksasyon gecikmesi sırasında 25 Hz irradyasyon uygulayarak presaturasyonla baskılandı. Her metabolit için sinyal yoğunlukları ve integralleri LMWM spektrada otomatik olarak değerlendirildi. Bu işlem belirlenen piklere uyumlu Lorentzian eğrileri ve önceden tanımlanan bölgelerde maksimum bulunarak yapıldı.



Resim 2.4. NMR bazlı metabolomikler Masarykova Üniversitesi Bio-NMR Merkezi'nde (Bruno, Çek Cumhuriyeti) 700 MHz'lik NMR spektrometresi ile ölçüldü.

2.5. RNA Ekstraksiyonu, cDNA Sentezi ve qPCR Analizi

Tavşanlardan alınan karaciğer örnekleri derhal sıvı azotta tutulup -70 °C'de saklandı. RNA ektraksiyonu sırasında eşit oranda (50 mg) karaciğer örnekleri bir skalpel yardımıyla parçalandıktan sonra TRI Reagent (Sigma, USA)'da homojenleştirildi. RNA izolasyon protokolü ve miktar ölçümleri Kurar ve ark (2010)'a göre yapıldı. Her tüpte RNA pelletleri 100 µl lik DEPC ile muamele edilen steril suda eritildi. 10 µl'lik her RNA örneği kalite kontrolü için %1'lik agarose jel'de elektroforez edildi. Saflığı değerlendirmek için nanodrop spektrofotometre (Thermo SCIENTIFIC, USA) kullanarak konsantrasyon ölçüldü ve 260/280 oranı hesaplandı. Üretici firma (DNAse-I, Fermentas, USA) kurallarına göre RNAse-free DNAse-I kullanarak 1 µg RNA, DNAse digesyonuna maruz bırakıldı.

Primerler ya yayınlanan sekanslardan (Zou ve ark 2013) elde edildi ya da IDT PrimerQuest Tool program kullanarak tavşan sekanslarından derive edildi. GAPDH mRNA ekpresyonu bu çalışmada deneysel modelde en uygun housekeeping gen olarak seçilen referans gen olarak kullanıldı. Real Time PCR reaksiyonları şablon olarak Light Cycler Nano Real Time PCR cihazında (Roche Diagnostics, GERMANY)12. 5 µl Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo SCIENTIFIC, LITHUANIA), 10 pMol her primer ve 2 µl izole RNA örneği (cDNA) kapsayan 25 µl reaksiyon volümlerinde sağlandı.

Real Time PCR profili 95°C'de10 dakikada başlangıç denatürasyonu idi. Bunu takiben 95°C'de 15 saniyede 40 siklusluk denatürasyon, 60°C'de başlangıç aşaması ve 72°C'de 30 saniyede ekstansiyon takip etti. Ek olarak, Roche Light Cycler Nano Tm çağrı operasyonu, temperatür analizini eritme için yapıldı. Real Time PCR ürünlerini doğrulamak için %2'lik agaroz jelde elektroforezle ayrıldılar ve ethidium bromide boyama ile görüntülendiler.

2.6. Bor Analizleri

Serum, karaciğer, yem, su ve dışkıda bor analizleri, Referans Materyal 8414 (National Institut of Standarts and Technology) kullanılarak ICP-AES ile yapıldı.

2.7. Histopatolojik İnceleme

Karaciğer ve böbreklerden alınan örnekler %10'luk tamponlu formolin solüsyonunda tespit edildi. Rutin takip işlemlerinden sonra parafin bloklar elde edildi. Bu bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen Eozin (HxE) ile boyandı. Tüm kesitler ışık mikroskobunda değerlendirildi. Lezyonlar hafif (+1), orta (+2) ve şiddetli (+3) olarak skorlandı.

2.8. İstatistiksel Analizler

Gruplar arasındaki farkın belirlenmesinde Independent T test kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesinde ANOVA, Tukey's testi kullanıldı.
$P < 0,05$ değeri istatistiki açıdan önemli kabul edildi.

Histopatolojik parametreler için verilerin istatistiki değerlendirilmesinde SPSS 13.0 (SPSS 13,0 for Windows/SPSS® Inc, Chicago, USA) paket programı kullanıldı. Verilerin gruplararası karşılaştırmasında ANOVA ve Duncan testi kullanıldı. $p<0.05$ değeri istatistiki açıdan önemli kabul edildi. Sonuçlar Mean±StDev olarak verildi.

mRNA istatistiksel analizinden önce hedef genlerin amplifikasyon etkinlikleri ve internal kontrol (GAPDH) cDNA seri dilüsyonlarının qPCR amplifikasyonu kullanılarak kontrol edildi. Doğrulanma temelinde hedef ve referans genlerin amplifikasyon etkinlikleri hemen hemen aynı olup data normalizasyon prosesi, Livak ve Schmittengen (2001)'e göre [$2^{-\Delta C}{}_T$ metot, burada $\Delta C'_T = C_{T,\ target} - C_{T,\ reference}$ sırayla hedef ve referans genler amplifikasyonları için eşik sikluslardır] uygulandı.

3. BULGULAR

3.1. Vücut ağırlıkları, yem-su tüketimleri, vücut kütle indeksleri

Deneme ve kontrol grubundaki tüm hayvanların yem tüketimlerinde günlük, haftalık ve aylık bazlarda bir farklılık olmamıştır. Su tüketimi, boraks grubunda aylık bazda diğerlerinden daha fazla olmuştur. Vücut ağırlıkları ve vücut kütle indeksleri tüm gruplarda değişmemiştir. Viseral yağlanma bireysel bazda görülmekle birlikte (Resim 3.1) gruplar bazında önemli farklılıklar göstermemiştir (Çizelge 3.1, 3.2 ve 3.3).

Çizelge 3.1. Yem tüketimi.

Dönem	**Yem tüketimi (kg)**	**Kontrol (n:10) Mean±SE**	**Boraks (n:10) Mean±SE**	**Susuz boraks (n:10) Mean±SE**	**Borik asit (n:10) Mean±SE**
1.ay	Günlük	1,61	1,58	1,61	1,58
	Haftalık	11,29	11,11	11,29	11,11
	Aylık	48,3	47,61	48,3	47,61
2.ay	Günlük	1,56	1,66	1,56	1,66
	Haftalık	10,93	11,66	10,93	11,66
	Aylık	46,87	49,99	46,87	49,99
3.ay	Günlük	1,32	1,26	1,4	1,26
	Haftalık	9,27	8,83	9,72	8,83
	Aylık	39,75	37,85	42	37,85

Çizelge 3.2. Vücut ağırlıkları ve 3. ay sonundaki toplam vücut kütle indeksleri.

Dönem	**Kontrol (n:10) Mean±SE**	**Boraks (n:10) Mean±SE**	**Susuz boraks (n:10) Mean±SE**	**Borik asit (n:10) Mean±SE**
1.ay (kg)	2,519	2,635	2,531	2,508
2.ay (kg)	$2,805^{a}$	$2,792^{ab}$	$2,600^{ab}$	$2,608^{ab}$
3.ay (kg)	3,004	2,028	2,841	2,745
Vücut kütle indeksi (kg/m^2)	36,44	38,62	34,12	31

Çizelge 3.3. Su tüketimi.

Dönem	Su tüketimi (L)	Kontrol (n:10) Mean±SE	Boraks (n:10) Mean±SE	Susuz boraks (n:10) Mean±SE	Borik asit (n:10) Mean±SE
1.ay	Günlük	2,79	2,79	3,58	2,79
	Haftalık	19,55	19,55	25,06	19,55
	Aylık	83,82	83,82	107,4	83,82
2.ay	Günlük	2,92	2,92	3,5	2,92
	Haftalık	20,44	20,44	24,5	20,44
	Aylık	87,69	87,69	105	87,69
3.ay	Günlük	3,02	3,04	4,02	3,07
	Haftalık	21,17	21,28	28,14	21,54
	Aylık	90,60	91,20	120,60	92,21

3.2. Biyokimyasal Parametreler

Biyokimyasal parametrelerden lipid profili açısından LDL kolesterol konsantrasyonları deneme gruplarında düşük bulunmuştur (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Plazma örneklerinde biyokimyasal parametreler.

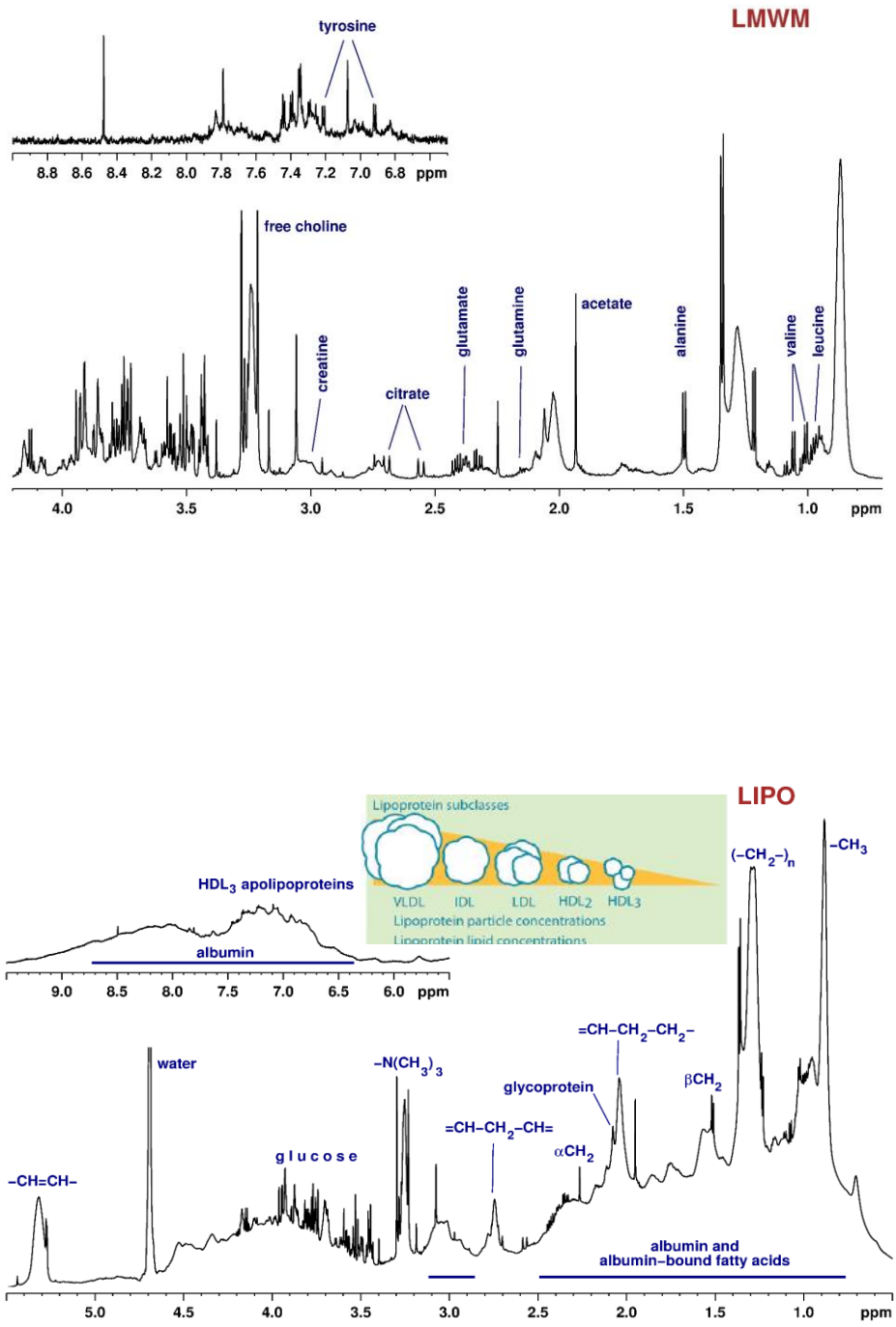
Parametreler	Kontrol (n:10) Mean±SE	Boraks (n:10) Mean±SE	Susuz boraks (n:10) Mean±SE	Borik asit (n:10) Mean±SE
LPO, μM/mg	1,55±0,12	1,49±0,08	1,45±0,11	1,86±0,07
İnsülin, μIU/L	9,52±0,92^{a}	11,0±1,01^{ab}	10,3±0,68 ^{ab}	13,6±0,63^{ab}
G6PDH, U/g Hb	3,72±0,47	4,25±0,27	4,61±0,82	3,86±0,40
AOP, μM/mg	1,07±0,04	1,18±0,07	1,20±0,02	1,09±0,04
Total-kolesterol, mmol/L	36,1±6,43	33,3±4,14	47,0±8,89	42,3±7,73
Trigliserid, mmol/L	33,0±4,38	34,2±3,32	35,4±5,39	38,0±5,34
HDL-kolesterol, mmol/L	21,7±2,44	22,3±1,76	27,2±2,85	23,3±2,20
LDL-kolesterol, mmol/L	12,0±2,59^{a}	7,55±1,91^{b}	7,66±2,36^{b}	6,9±2,87^{b}
Glikoz, mg/dL	123±14,7	139±13,2	135±10,6	136±13,3

3.3. Metabolomik Değerlendirme

Alanin, glutamat, lösin, valin, sitrat ve kreatin seviyelerinde gruplar arasında farklılık bulunmazken tirozin seviyeleri gruplar arası önemli idi. Asetat, kolin ve tirozin seviyeleri kontrol grubuna göre susuz boraks grubunda 2 kat, borik asit grubunda 3 kat daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.5) (Şekil 3.1. LMWM window).

Çizelge 3.5. NMR bazlı metabolit konsantrasyonları *[µmol/ml]*.

	Kontrol (n:10) Mean±SE	**Boraks (n:10) Mean±SE**	**Susuz boraks (n:10) Mean±SE**	**Borik asit (n:10) Mean±SE**
Alanin	0,010 ± 0,002	0,008 ± 0,003	0,013 ± 0,005	0,012 ± 0,004
Glutamat	0,002 ± 0,003	0,003 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,006 ± 0,04
Lösin	1,47 ± 0,54	1,18 ± 3,3	1,08 ± 0,010	1,18 ± 0,001
Valin	0,12 ± 0,033	0,13 ± 0,132	0,18 ± 0,021	0,14 ± 0,005
Mannoz	0,004 ± 0,0009	0,003 ± 0,0042	0,173 ± 0,002	0,15 ± 0,008
Sitrat	0,057 ± 0,018	0,041 ± 0,06	0,052 ± 0,056	0,035 ± 0,0027
Kreatin	0,05 ± 0,001	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,041	0,032 ± 0,004
Glutamin	0,026 ± 0,004	0,031 ± 0,03	0,023 ± 0,011	0,033 ± 0,002
Tirozin	0,062 ± 0,02 [a]	0,071 ± 0,012 [ab]	0,123 ± 0,008 [b]	0,255 ± 0,006 [c]
Asetat	0,026 ± 0,01[a]	0,025 ± 0,012 [a]	0,049 ± 0,013 [b]	0,075 ± 0,005 [c]
Kolin	0,003 ± 0,003 [a]	0,003 ± 0,024 [a]	0,006 ± 0,025 [b]	0,009 ± 0,003 [c]



Şekil 3.1. NMR spektral karekteristikler ve iki moleküler pencereden metabolik içerikler (LIPO ve LMWM). LIPO pencere makromoleküllerden (çoğunlukla lipoprotein ve albümin) kaynaklanan büyük sinyaller ağırlıklıdır, bu yüzden daha küçük moleküllerin belirlenmesi kolaylaşır.

3.4. Lipoprotein Alt Sınıfları

Lipoprotein alt sınıflarından küçük ve çok küçük LDL partikül konsantrasyonları susuz boraks ve borik asit gruplarında azalırken, küçük HDL partikül konsantrasyonları aynı gruplarda artmıştır. Çok küçük VLDL partikül konsantrasyonları susuz boraks grubunda artarken, orta küçük LDL konsantrasyonu sadece boraks gurubunda artmıştır. Büyük HDL konsantrasyonu tüm gruplarda azalmıştır. (Çizelge 3.6) (Şekil 3.1 LIPO window).

Çizelge 3.6. Gruplararası lipoprotein alt sınıfların partikül seviyeleri (mmol/L).

Lipoprotein partikülleri		**Kontrol (n:10)**	**Boraks (n:10) Mean±SE**	**Susuz boraks (n:10) Mean±SE**	**Borik asit (n:10) Mean±SE**
VLDL	**Büyük VLDL**	>60	39,80±1,42 ^{ab}	49,10±0,21 ^{ab}	51,80±1,24 ^{ab}
	Küçük VLDL	35–60	33,95±,40 ^{ab}	53,50±1,39 ^{ab}	35,95±3,30 ^{ab}
	Çok küçük VLDL	27–35	32,03±0,80 ^{ab}	61,95±1,19 ^{b}	43,95±1,39 ^{ab}
LDL	**IDL**	23–27	43,52±1,39 ^{ab}	47,52±1,11 ^{ab}	37,25±1,1 ^{ab}
	Büyük LDL	21,2–23	49,32±2,41 ^{ab}	39,32±1,33 ^{ab}	41,32±1,53 ^{ab}
	Orta küçük LDL	18–21,2	64,13±2,74 ^{b}	21,23±24,2 ^{ab}	19±22,2 ^{ab}
	Küçük LDL	19,8–21,2	18,41±0,81 ^{ab}	7,54±0,81 ^{b}	8,45±0,81 ^{b}
	Çok küçük LDL	18–19,8	16,51±0,25 ^{ab}	7,25±0,51 ^{b}	6,95±0,15 ^{b}
HDL	**Büyük HDL**	8,8–13	3,23±0,47 ^{b}	5,02±0,41 ^{b}	4,13±0,17 ^{ab}
	Orta HDL	8,2–8,8	11,76±0,10 ^{ab}	10,16±0,31 ^{b}	11,06±0,30 ^{b}
	Küçük HDL	7,3–8,2	22,8±16,29 ^{ab}	92,28±27,12 ^{b}	77,28±71,21 ^{b}

3.5. Nükleer Hormon Reseptörleri

Nükleer hormon reseptörlerinden PPAR-α borik asit grubunda, PPAR-β/δ susuz boraks ve borik asit gruplarında önemli derecede düşük bulunmuştur (Çizelge 3.7). PPAR ailesinin primer ekspresyonları çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Gruplararası Nükleer Hormon Reseptörleri.

Nükleer Hormon Reseptörleri	Kontrol (n:10) Mean±SE	Boraks (n:10) Mean±SE	Susuz boraks (n:10) Mean±SE	Borik asit (n:10) Mean±SE
PPAR-α	1,040±0,07^{ab}	1,220±0,13^{a}	0,870±0,07^{ab}	0,730±0,17^{b}
PPAR-β/δ	0,035±0,004^{a}	0,029±0,001^{ab}	0,023±0,001^{bc}	0,018±0,003^{c}
PPAR-γ	0,053±0,006	0,057±0,006	0,042±0,006	0,049±0,008

Çizelge 3.8. Real-time PCR analizinde kullanılan PPARα, β/δ, ve γ genlerin primerleri.

PPAR ailesi	Primer sekans	PCR ürün (bp)	Değerlendirme numarası	Referanslar
PPARα	ACATGGAGACGCTGTGTATG TGGCAGCAGTGGAAGATG	103	AF013264	
PPARβ/δ	ATCAGGCTTCCACTACGGTGTTCA CTGGCACTTGTTGCGGTTCTTCTT	136	XM_001498870	
PPARγ	TTCTGTCAAGATCGCCCTCG TGGGGATGTCTCATAATGCCA	193		Zou ve ark 2013
GAPDH	GCTGAACGGGAAACTCACT CCTGCTTCACCACCTTCTT	125	NM_001082253	

3.6. Bor Seviyeleri

Serum bor seviyeleri, deneme gruplarında istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Susuz boraks ve borik asit gruplarının dışkı bor seviyeleri de yüksek bulunmuştur. Karaciğer bor seviyelerinde bir değişiklik olmamıştır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Bor Seviyeleri (ppm).

	Kontrol (n:10) Mean±SE	**Boraks (n:10) Mean±SE**	**Susuz boraks (n:10) Mean±SE**	**Borik asit (n:10) Mean±SE**
Serum	0,17±0,26[a]	1,31±0,04[b]	1,61±0,06[b]	1,37±0,01[b]
Karaciğer	0,33±0,08	0,46±0,004	0,42±0,03	0,47±0,03
Yem	3,8807	3,8807	3,8807	3,8807
Su (bor ileve öncesi)	0,0091	0,0091	0,0091	0,0091
Dışkı	1,779[a]	2,179[ab]	3,423[b]	3,179[b]

3.7. Histopatolojik Bulgular

Karaciğer ve böbrekteki histopatolojik değişikliklerin gruplara dağılımları Çizelge 3.10 ve 3.11'de verildi. İstatistiksel fark görülmese de bor kullanımının karaciğerde hepatositlerde dejeneratif değişiklikleri azalttığı saptanmıştır.

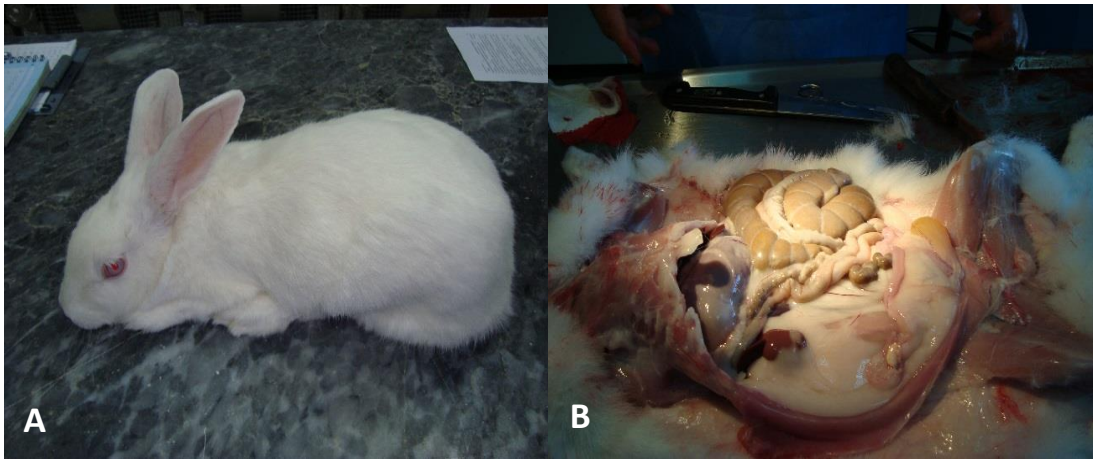
Böbrek değişiklerine bakıldığında boraks grubu hariç diğer bor gruplarının tubul epitellerinde belirgin bir değişikliğe yol açmadığı (Resim 3.5-A. B. C. D) ve gözlenen lezyonların kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görüldü (Çizelge 3.11). Sulu boraks grubunda ise örneklerin hemen hepsinde tubul epitellerinde hafif şiddette (+1) dejeneratif değişikliklere rastlandı (Resim 3.6). Ayrıca borik asit grubunda bir hayvanda mineralizasyon, bir hayvanda da amiloidoza rastlandı.

Çizelge 3.10. Karaciğerdeki histopatolojik lezyonların gruplara dağılımı.

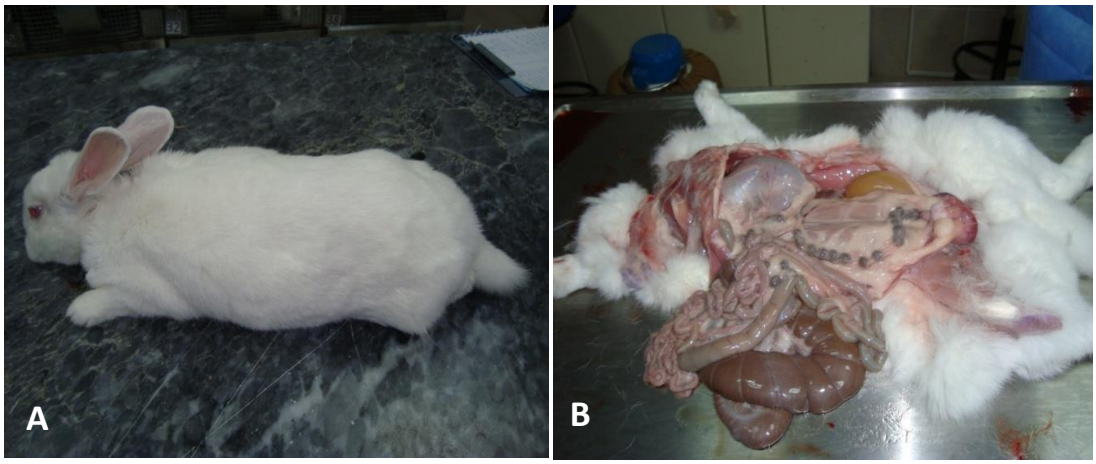
Karaciğer (Mean± SD)	**Kontrol (n:10) Mean±SE**	**Boraks (n:10) Mean±SE**	**Susuz boraks (n:10) Mean±SE**	**Borik asit (n:10) Mean±SE**
Hepatositlerde dejenerasyon	1,000±0,645	0,929±0,450	0,786±0,756	0,500±0,289
Fokal nekroz	0,714±0,756	0,357±0,476	0,286±0,567	0,143±0,378
Portal alanda mnh inf.	1,143±0,690	0,857±0,627	1,071±1,397	0,643±0,476

Çizelge 3.11. Böbrekteki histopatolojik lezyonların gruplara dağılımı.

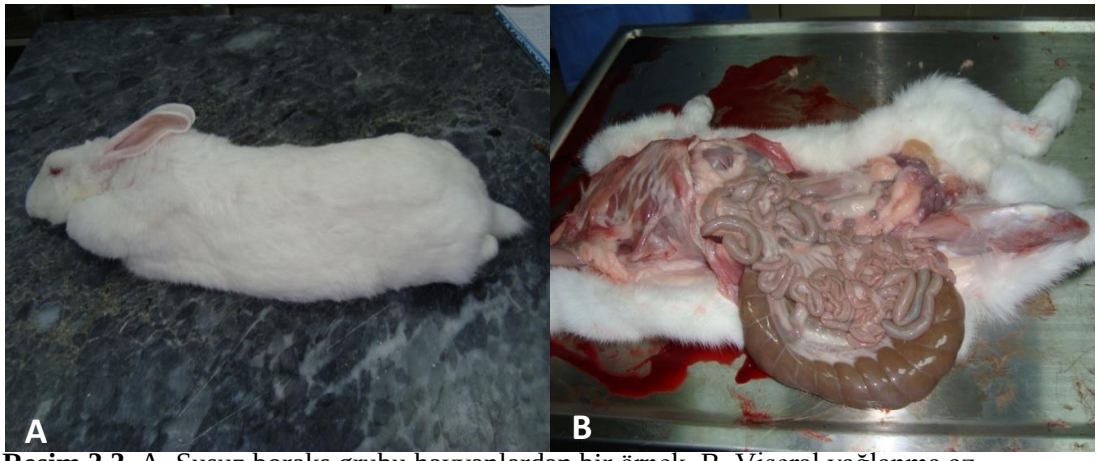
Böbrek (Mean± SD)	**Kontrol (n:10) Mean±SE**	**Boraks (n:10) Mean±SE**	**Susuz boraks (n:10) Mean±SE**	**Borik asit (n:10) Mean±SE**
Tubullerde Dilatasyon	0,571±0,345	0,643±0,627	0,500±0,289	0,571±0,450
Tubul epitelinde dejenerasyon	0,929±0,345	1,143±0,627	0,714±0,267	0,714±0,393
Hiyalin silindirleri	0,286±0,567	0,429±0,535	0,714±0,267	0,357±0,378
İnt. mnh. inf.	0,286±0,488	0,714±0,809	0,429 ±0,60	0,3571±0,244



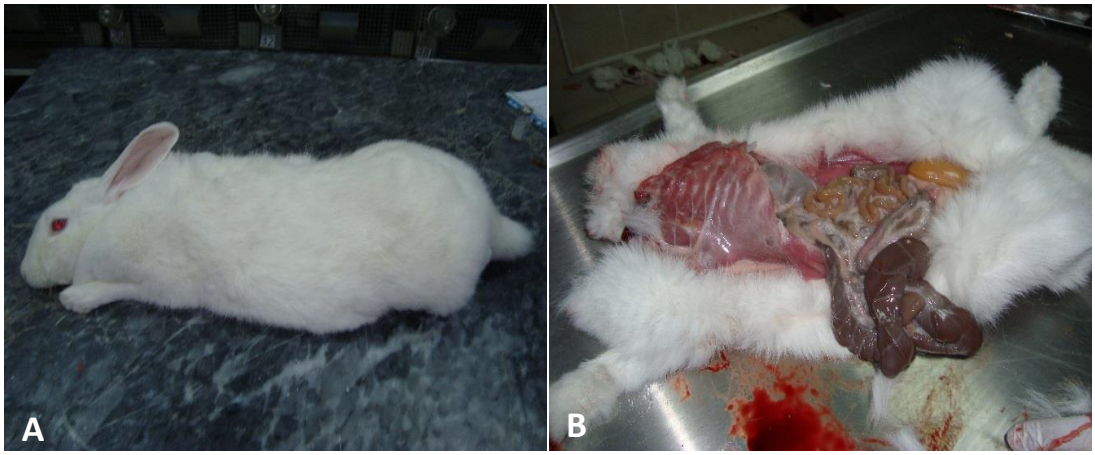
Resim 3.1. A. Kontrol grubu hayvanlardan bir örnek. B. Viseral yağlanma belirgin.



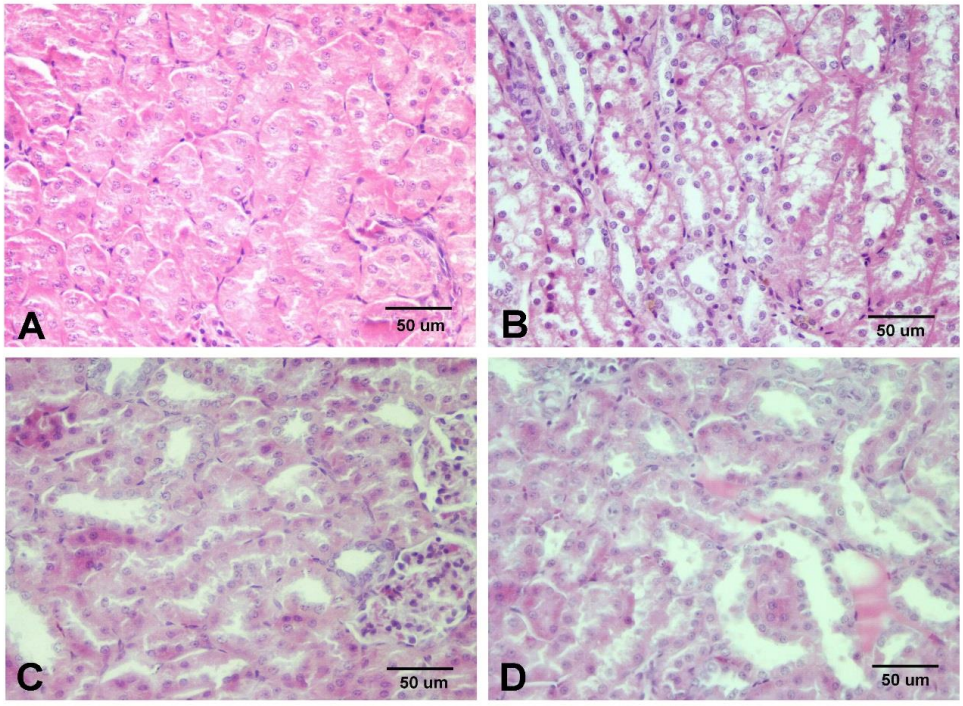
Resim 3.2. A. Boraks grubu hayvanlardan bir örnek. B. Viseral yağlanma az.



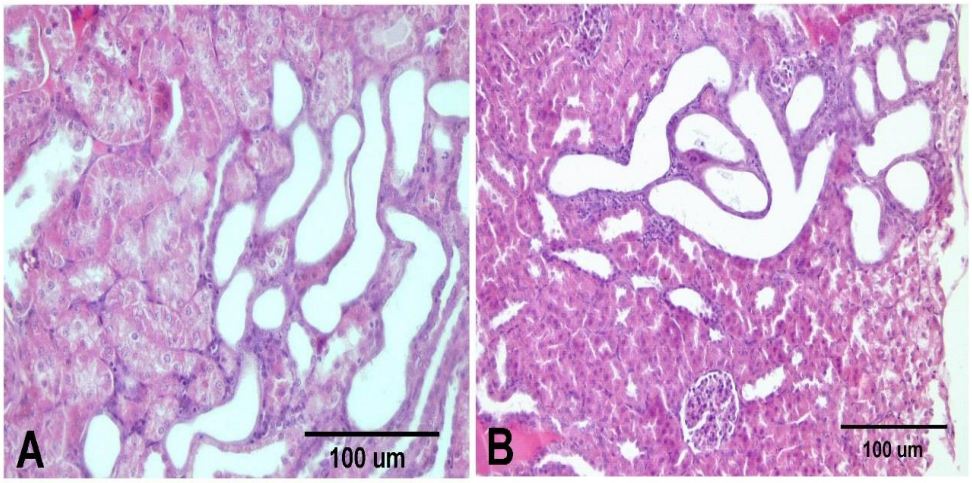
Resim 3.3. A. Susuz boraks grubu hayvanlardan bir örnek. B. Viseral yağlanma az.



Resim 3.4. A. Borik asit grubu hayvanlardan bir örnek. B. Viseral yağlanma yok.



Resim 3.5. Böbrekte tubuler dejenerasyon. HxE. A. Kontrol grubu. B. Boraks grubu. C. Susuz boraks grubu. D. Borik asit grubu.



Resim 3.6. Böbrekte tubuler dejenerasyon ve dilatasyon. HxE. A. Kontrol grubu. B. Boraks grubu.

4. TARTIŞMA

Bu araştırma, yüksek proteinli ve enerjili diyetle beslenen tavşanlarda farklı bor bileşikleri ilavesinin etkilerini '*omiks*' bir yaklaşımla değerlendiren ilk çalışmadır. Bu çalışmada, yüksek proteinli ve enerjili diyetle beslenen deney hayvanlarının (tavşanlarda) içme sularına, bor bileşikleri (sulu boraks, susuz boraks ve borik asit) 30 mg B/L dozunda ilave edilmiş ve borun obezite, karaciğer yağlanması ve steatohepatitise etkinliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla yüksek teknolojiler kullanarak metabolomikler, lipoprotein alt sınıfları ve nükleer hormon reseptörleri analizleri yapılmıştır.

İnsanlarda primer karaciğer yağlanmalı hastaların diyetleri genellikle yüksek seviyede karbonhidrat, yağ ve kolesterol ile karakterizedir. Bu diyet özellikleri hastalarda hepatik lipid metabolizmasını etkiler (Fan ve Cao 2013). Normal proteinli diyetlerle beslenen farelere kıyasla yüksek protein içeren diyetlerle beslenenlerde daha düşük vücut ağırlığı, viseral ve hepatik yağlanma gözlenmiştir (Terashima ve ark 2014). Bu çalışmada deneme süresince vücut ağırlıkları ve vücut kütle indeksleri ile birlikte viseral ve karaciğer yağlanması bakımından bütün gruplarda önemli değişiklik belirlenmemiştir. Bu durum, tüm grupların enerji protein dengesi sağlanmış diyetlerle beslenmiş olmasına bağlanabilir. Wu (2009)'ya göre aminoasit formundaki enerjinin karaciğerde daha az etkili bir şekilde yağa transfer edildiği hala bir soru işaretidir.

Hayvan denemeleri, özellikle gebelerde kronik borik aside maruz kalmaya bağlı renal toksisite ihtimalini akla getirmektedir. Bunlar böbrek boyutunda küçülme ve renal tubuler hasarla karakterizedir. Bununla birlikte renal fonksiyon bozukluğunun biyonükleer hormon kimyasal kanıtı bulunamamıştır. Bu yüzden borik asit doğrudan nefrotoksik etkileri olabilse de mevcut bilgi tartışmalıdır (Pahl ve ark 2005). Borik asit veya boraksın oral LD50 değerleri köpek, kedi ve tavşanlar için 250-350 mg/kg'dır. Ratlara 100-275-400 mg/kg/gün dozunda 45 gün süreyle borik asit verildiğinde böbrek dokusunda histopatolojik değişiklikler belirlenmiştir (Sabuncuoğlu ve ark 2006). Tavşanlara 800 mg/kg/günden borik asit 4 gün süreyle verildiğinde anoreksi, kilo kaybı ve ishal gözlenmiş; 850 ve 1000 mg/kg/gün borik asit 4 gün süreyle verildiğinde de tavşanların hepsi ölmüştür (EPA 2001). Başka bir çalışmada tavşan-

lar 250 mg/kg/gün borik asit 30 gün süreyle maternal toksisite göstermiştir (Heindel ve ark 1994). Bir çalışmada, deneme gruplarında 96 saat aralıkla 90, 270 ve 450 mg/kg dozda borun oral verildiği tavşanlarda klinik ve toksik herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (Başoğlu ve ark 2010). Bu çalışmada ise bor kullanımı daha pratik hale getirilmiş ve hayvanların içme suları 30 mg B/L bor içerecek şekilde borlu içme suyuna dönüştürülmüştür. Bu araştırma ile borun yem ya da gıdalara toz şeklinde ilavesi yanında içme sularına da ilave edilebileceği belirlenmiştir. Ayrıca borun çeşitli literatürlerde (WHO 1998, EPA 2001) de ifade edildiği gibi tamamına yakınının emildiği ve idrarla atıldığı ifade edilmektedir. Oysa bu çalışmada borun içme sularına ilave edilerek kullanılması ve dışkıda belirlenmesi, borun idrarın yanında bir kısmının da emilmeyerek dışkı ile atıldığını göstermektedir. Bu şekilde kullanılan borun tamamının emilmediği, kan seviyelerinin yükseldiği ve karaciğerde birikmediği bor analizlerinden anlaşılmıştır. Deneme süresince klinik-toksik bulgulara rastlanmazken kontrol grubu hayvanlarda karaciğer hepatositlerinde önemsiz dejeneratif değişikliklerin olduğu belirlenmiştir. Borun deneme grubu hayvanlarda karaciğederki dejeneratif değişiklikleri azalttığı, böbrekte belirgin bir bozukluğa yol açmadığı ve bu etkinlikte borik asidin daha etkin olduğu, ancak uzun süreli sulu boraks kullanımının devam ettiği durumlarda böbrek fonksiyonlarının klinik takibinin yapılması gerektiği söylenebilir.

Primer karaciğer yağlanması, hafif yağlanmadan şiddetli steatohepatitise kadar geniş bir spektrum gösterir. Obezite, insulin rezistansı ve hiperlipidemi prevalansının artışına bağlı olarak karaciğer yağlanmalı hasta sayısı da artmaya devam etmektedir. Obezite, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar, metabolizma ile ilişkili olup enerji bakımından zengin beslenen ve hareketsiz toplumlarda halk sağlığını önemli oranda tehdit etmektedir. Steatohepatitise duyarlılık farklılıkları ve onun siroza ilerleyişi hücre içi ağını ilgilendiren bütün genetik ve dış faktörlerin karmaşık bir etkileşimine atfedilmektedir. Şeker ve rafine karbonhidrat tüketiminin artması insülin ve insülin rezistansını da artırmakta ve karaciğerde yağ birikimine yol açmaktadır (Jozefczuk ve ark 2012). İnsan hekimliğinde bahsedilen bu hastalıkların çoğuna, pet hayvanlarda da rastlanmaktadır. Adı geçen hastalıklara benzer olarak, sütçü sığırların peripartum dönemlerinde görülen, etiyolojik olarak birbiri ile ilişkili karaciğer yağlanması, ketozis ve abomazum deplasmanı gibi üretim hastalıkları, bu konudaki iler-

lemelere rağmen hala yüksek insidans ve ekonomik kayıplarla seyretmektedir (Mulligan ve Doherty 2008).

Son yıllardaki yoğun araştırmalara rağmen, karmaşık metabolik hastalıkların gerisindeki moleküler patogenezisin önemli bir kısmı hala bilinmemektedir. Son zamanlarda, karaciğer yağlanmasını kontrol eden fizyopatolojik durumların açıklanmaya çalışılması *'omikler'* (transkriptomikler, genomikler ve lipidomikler) denen geniş ölçekli çalışmalardan yararlanarak mümkün olmaktadır (Martel ve ark 2012). '*Omikler*' tekniklerinin özellikle metabolomiklerin, insanlarda beslenmeye yönelik araştırmalarda yeni teknolojilerle birlikte entegratif uygulanmasıyla beslenmenin değerlendirilmesinde yeni biyomarkırları identifikasyonu için artan ve ihtiyaç duyulan bir yaklaşımı temsil etmektedir (Giby ve Ajith 2014). Genetik, epigenomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik araştırmalar hücreler dokular ve organlarla ilişkili çoklu hastalıklarda etiyolojik proseslerin geniş ölçekli kesitlerini elde etme imkanı sağlamaktadır. Bunlar, geleneksel dar yaklaşımların ötesine geçme fırsatı vermekte ve özel bozuklukların kritik biyolojik proseslerini belirlemeyi de sağlamaktadır (Meng ve ark 2013). Bu çalışmada da son yıllarda beşeri hekimlikte yaygın olarak karşılaşılan obezite ve bununla ilişkili metabolik hastalıkların fizyopatolojilerinin aydınlatılmasında kullanılan *'omik'* tekniklerin, veteriner sahada da kullanılabilmesi amaçlanmıştır. Bu sebeple borun adı geçen bozukluklarda etkinliği, metabolomik ve transkriptomik tekniklerle tavşanlarda değerlendirilmiştir.

Hafif primer karaciğer yağlanmanın ilerlemesiyle oluşan steatohepatitisin patobiyolojisine yönelik nispeten az sayıda metabolomik çalışmalar bulunmaktadır (Beyoğlu ve Idle 2013). Li ve ark (2011), primer karaciğer yağlanmalı hastalarda NMR bazlı yaptıkları bir çalışmada glikoz, glutamat ve taurin konsantrasyonlarını yüksek bulmuşlardır. Yine Başoğlu ve ark (2011), tavşanlarda borun obezite ve karaciğer yağlanmasında etkinliğini NMR-bazlı metabolomik değerlendirdiklerinde metionin, alanin, pirüvik asit ve kreatin metabolitlerinin dikkat çekici değişiklikler gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada da NMR-bazlı metabolomik değerlendirmede kreatin, glutamin, glutamat, kolin, sitrat, asetat, valin, lösin, tirozin metabolitleri ölçülmüş; bunlardan asetat, kolin ve tirozin seviyeleri susuz boraks ve borik asit gruplarında aktive edilmişlerdir. Kolin eksikliği karaciğer yağlanması ile karaciğer ve kas hasarına neden olur (Ueland 2011, Tirosh 2014). Asetat, biyolojide yaygın bir anyon

olup çoğunlukla organizmalar tarafından Acetil-CoA formunda kullanılır. Proteinlerin tirozin rezidülerine fosforilasyonu, leptin ve insülinin kendi hedef hücrelerine etkilerinde anahtar rol oynar (Knobler ve Elson 2014). Bor bileşikleri tarafından karaciğer ve enerji metabolizması ile ilgili bu metabolitlerin aktive edilmesi, borun etkinliğinin daha iyi anlaşılmasına ışık tutmaktadır.

İnsan hekimliğinde obezite, diabetes ve kardiyovasküler hastalıklarda; veteriner hekimlikte de benzer hastalıklarla birlikte sütçü sığırların peripartum üretim hastalıklarının (ketozis, karaciğer yağlanması, klinik-subklinik hipokalsemi, abomazum deplasmanı, subklinik rumen asidozu, düşük süt yağı sendromu, topallık, plasenta retensiyonu ve metritis) öngörüsünde ve belirlenmesinde kullanılan lipid profil göstergeleri ile bunlara yönelik tedavi uygulamaları halen tartışmalıdır. İnsan hekimliğinde özellikle lipoproteinler (HDL ve LDL) adı geçen hastalıklardan sorumlu tutulmakta ve hatta bunlar sıra ile 'iyi kolesterol' ve 'kötü kolesterol' adları ile anılmaktadır. Son yıllarda bu klasik parametrelerin alt sınıflarına yönelik araştırmalar dikkat çekmektedir. Aynı LDL kolesterol konsantrasyonuna sahip hastalarda farklı sayıda LDL partikülü bulunabildiği ve bu yüzden onların kardiyovasküler risklerinin de farklı olduğu ifade edilmiştir (Jeyarajah ve ark 2006). Küçük dansiteli LDL, kardiyovasküler bir risk oluştuğunu temsil eder, çünkü bu partiküller kardiyovasküler hastalıkla birlikte bulunabilmektedir. Obez şahıslarda, sıkça aterojenik dislipidemi ile birlikte küçük dansiteli LDL, trigliserid, VLDL ve apolipoprotein-B seviyeleri yüksek; HDL seviyeleri ise düşüktür. Metabolik sendrom gibi obezite ile ilişkili eş zamanlı hastalıklar, dislipidemi ile karakterizedir. Bu yüzden, böyle şahıslarda LDL alt sınıflarını uygun bir şekilde modüle eden ilaçlar klinik yönden değerlidir. Statinler, seçilecek lipid düşürücü ilaçlardır. Ayrıca, statinlerden başka anti-obezite ve lipid düşürücüler de böyle hastalarda faydalıdır. Bununla birlikte, anti-obezite ilaçların kardiyovasküler hastalığa etkileri belirsizdir (Nikolic ve ark 2013). Karmaşık dislipidemili hastalarda fibratlar ve niasin ile tedavi faydalı gibi görünmektedir (Floretin ve ark 2010). Niasin, klinik uygulamada en etkili HDL kolesterol artırıcı ilaçtır. Bunun yanında Niasin, TG ve LDL-C dahil diğer plazma lipidlerini düşürücü etkiye sahiptir. Bazı çalışmalara göre Niasinin kardiyovasküler riski azaltmada veya aterosklerozu stabilize etmede ve geriletmede terapötik etkinliği vardır (Michos ve ark 2012). Niasin, lovastatin ile birlikte kullanıldığında, sadece statinin kullanıldığı tedaviye göre kardiyo

protektif etkili HDL2b alt sınıfı oranını ve ayrıca düşük HDL-C'li hastalarda LPA-I seviyesini seçici bir şekilde artırmada daha etkili bulunmuştur (Sakai ve ark 2001, Bays ve McGovern 2003). Düşük pre-â-HDL'li az sayıda diyabetli hastalarda yapılan bir çalışmada niasin tedavisi pre-â-HDL seviyesini daha da düşürmüştür, zira bu ilaç diyabetlilerde pre-â-HDL partikül olgunlaşmasına ve kolesterol transportunun tersine dönmesine neden olur (Pan ve ark 2011). Evcil ve deney hayvanlarında (tavşanlarda) borun obezite ve karaciğer yağlanmasına etkinliğine yönelik çalışmalarda (Başoğlu ve ark 2000, 2002 ve 2010), HDL ve LDL konsantrasyonlarının değişmediği, viseral yağlanma ve karaciğerde yağ infiltrasyonunun engellendiği, HDL'nin % oranının arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda yüksek proteinli ve enerjili yemle beslenen tavşanlarda, LDL kolesterol seviyeleri ile lipoprotein alt küçük ve çok küçük LDL partikül konsantrasyonları susuz boraks ve borik asit gruplarında azalırken, küçük HDL partikül konsantrasyonları aynı gruplarda artmıştır. Çok küçük VLDL partikül konsantrasyonları susuz boraks grubunda artarken, orta küçük LDL konsantrasyonu sadece boraks gurubunda artmıştır. Büyük HDL konsantrasyonu tüm gruplarda azalmıştır. Bu durumda, lipid profilinin geleneksel parametreleri olan total kolesterol, HDL, LDL ve VLDL kolesteroller ve trigliseride göre lipoprotein alt sınıflarının diyagnostik ve terapötik öngörüde daha önemli olduğu ifade edilebilir.

Yangı, lipid ve glikoz metabolizmasında PPAR'lar etkili olup karaciğerde trigliserid birikiminde rol alırlar. Ayrıca bunlar, reverzibil karaciğer yağlanmasının irreverzibil hale hatta ileri lezyonlara dönüşümüne de etkili olabilirler (Tailleux ve ark 2012). PPAR-β/δ iskelet kası, adipositler, makrofajlar, akciğerler, beyin ve deriden salınır. Yağ asidi metabolizmasını artırırken yangıdan kaynaklı makrofajı baskılar. PPAR-β/δ yangısal mediatörlerin ve adhezyon moleküllerinin salınımını azaltır, bu da aterogenezis zayıflatılmasında potansiyel rolü olduğunu düşündürmektedir (Tyagi ve ark 2001). PPAR-α ve PPAR-β/δ çoğunlukla enerji tüketimini kolaylaştırırken, PPAR-γ adipogenezisi artırarak enerji birikimine katkıda bulunur. PPAR-α çoğunlukla yağ asit metabolizmasını etkiler ve onun aktivasyonu lipid seviyelerini düşürür, oysa PPAR-γ çoğunlukla adipogenezis, enerji balansı ve lipid biyosentezi regülasyonunda yer alır. PPAR-β/δ çoğunlukla iskelet ve kalp kaslarında yağ asidi oksidasyonunda yer alırken kan glikozu ve kolesterol seviyelerini de düzenler. Birkaç doğal ve sentetik ligand bu reseptörlerin ekspresyonunu etkilemektedir. Sentetik

ligandlar dislipidemi tedavisinde (örneğin, fibratlar-PPAR-α aktivatörleri) veya diabetes mellitus tedavisinde (örneğin, thiazolidinedionlar-PPAR-γ agonistleri) yaygın şekilde kullanılmaktadır. Yeni jeneresyon ilaçlar (PPAR-α/γ ikili agonistleri) hipolipemik, hipotansif, antiaterojenik, antienflamatuvar ve antikoagulan etkilidir. PPAR-β/δ aşırı salınımı, yüksek yağlı diyetlerde bile, obezite gelişimini önler ve kalp hücrelerinde yağ birikimini azaltır. Doğal PPAR agonistlerinin glikoz ve yağ metabolizmasına etkisi ve ekspresyonu hakkında kesin bilgi olmamakla birlikte, aynı ligand, birkaç reseptörü etkilediği için çok sayıda farklı sonuçlarla karşılaşılmaktadır. PPAR'lar değişik doğal ve sentetik lipofilik asitleri (esansiyel yağ asitleri, eikosanoidler, fitanik asit ve palmitoylethanolamid gibi) bağlama yeteneğine sahiptir (Grygiel-Górniak 2014). PPAR-α yokluğunda hayvanlar karaciğer yağlanmasına duyarlıdır (Hashimoto ve ark 2000) ve hepatik proenflamatuar sitokinlerin aktivasyonu kolaylaşır. Bu yüzden PPAR-α ve PPAR-γ, ilk yangısal reaksiyonları önlemede ve karaciğer hücrelerini korumada dikkate alınmaktadır. Yüksek enerjili diyet, farelerde PPAR-α protein ekspresyon seviyelerini önemli derecede azaltmıştır (Giby ve Ajith 2014). PPAR-α yağ asidi alımını, beta-oksidasyonunu, apolipoprotein ekspresyonunu ve trigliserid metabolizmasını indükler. PPAR-γ ekspresyonunun obezite ile ilgili olduğu ifade edilirken obez ratlarda PPAR-γ ekpresyonu yüksek bulunmuştur. (Ryu ve ark 2013). PPAR-γ, glikoz ve lipid homeostazisinin merkezinde yer alan bir nükleer reseptör olup karaciğer yağlanmalı obez hastalarda artmaktadır. Resveratrol ilave edilen yüksek enerjili diyetle beslenen farelerde adipozis ile ilişkili genlerin mRNA analizinde PPAR-γ baskılanmıştır (Andrade ve ark 2014). Benzer etkilerden Carpéné ve ark (2014) da bahsetmektedir. Borun obezite, karaciğer yağlanması ve steatohepatitise ekinliğinin nükleer hormon reseptörleri bazında değerlendirildiği bu ilk çalışmada da PPAR-α borik asit grubunda ve PPAR-β/δ susuz boraks ve borik asit gruplarında önemli derecede düşük bulunmuştur. Bor bileşiklerinin içme suyuna katılmasıyla obezitenin, karaciğer yağlanmasının, hepatositlerde dejenerasyon ve fokal nekrozun azalması, PPAR-α ve PPAR-β/δ protein ekspresyonlarının azalması ile örtüşmektedir. Bu da yukarıda bahsedilen birçok çalışma (Ryu ve ark 2013, Giby ve Ajith 2014) ile uyum göstermektedir. Bu çalışmada PPAR-γ ekspresyonunun istatistiksel olmasa da azalma eğilimi göstermesi, hepatositlerdeki düzelme ile ilgili olduğunu gösterebilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Anabilim Dalımız'da daha önce bor konusundaki çalışmalar, bu araştırma ile daha ileri aşamaya ulaşmış, yüksek proteinli ve enerjili diyete bağlı hepatositlerdeki dejeneratif değişikliklerin içme suyuna bor katkısı ile azaldığı *'omik'* yaklaşımla daha iyi anlaşılmıştır.

2. Uzun süreli bor kullanımı böbrek epitelllerinde belirgin bir değişikliğe yol açmamıştır.

3. Obezite, karaciğer yağlanması ve steatohepatitis gibi bozuklukların lipid profilde yer alan trigliserid, total kolesterol ve lipoproteinler (HDL-kolesterol, LDL-kolesterol ve VLDL-kolesterol) gibi geleneksel parametrelerin çoğu defa kaba kaldığı, bunun için lipoprotein alt sınıflarının daha önemli olduğu, geleneksel parametrelere aynı seviyede sahip farklı bireylerin, farklı lipoprotein partiküllerine sahip olabileceği ve adı geçen bozukluklar için farklı risk taşıyabilecekleri ifade edilebilir.

4. Asetat, kolin ve tirozin gibi metabolitler, adı geçen bozuklukların öngörüsü ve tedavisinde yeni aday biyomarkırlar olabilir.

5. Borun etkinliğinde, karaciğerde dejeneratif değişikliklerin azalması ile birlikte yağ asidi oksidasyonunda yer alan genlerden PPAR-α ve β/δ mRNA ekspresyon seviyelerinin de azaldığı, glikoz ve lipid homeostazisinin merkezinde yer alan PPAR-γ mRNA ekpresyon seviyesinin azalma eğiliminde olduğu gözlenmiştir.

6. Yukarıda bahsedilen etkinliklerde, borik asit daha faydalı bulunmuştur.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bor Bileşiklerinin Obez Tavşanlarda Lipoprotein Alt Sınıflarına ve Nükleer Hormon Reseptörlerine Etkileri

ÖZGÜR YAMAN
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ/KONYA-2014

Obezite insan hekimliğinde özellikle gelişmiş ülkeler için önemli bir sağlık sorunudur. Köpeklerde obezite insidansı % 24-44 arasında olup tedavisi de zordur.

Karaciğer yağlanması (fatty liver, steatozis), insanlarda (alkole bağlı olmayan) oldukça yaygın bir hastalık olup steatohepatitis, siroz ve hepatoselüler kanser de dâhil olmak üzere ilerleyici karaciğer hastalığına neden olabilmektedir. Karaciğer yağlanması yüksek verimli sütçü sığırlarda da periparturient periyodu etkileyen ve süt sığırcılığı işletmelerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olan metabolik bir hastalıktır. İnsanlarda bu hastalık için, kilo kaybından bağımsız ve doğrudan karaciğer hasarını azaltacak veya tersine döndürecek ilaçlar henüz onaylanmamıştır. Sütçü sığırlarda da önlem ve tedavi benzer olup bunlar, negatif enerji balansından korunmayı ve adipoz dokudan yağ asitleri mobilizasyonunu en aza indirmeyi hedefler.

İleri teknolojilerde çok büyük avantajlar sağlayan stratejik madenimiz bor, sağlık alanında da insan ve veteriner hekimliği ile tarımı ilgilendiren konularda çeşitli yönlerden araştırılmaktadır. Anabilim dalımızda borun obezite ve karaciğer yağlanması başta olmak üzere sağlıkla ilgili etkinlikleri hakkında önemli çalışmalar (projeler ve yayınlar) vardır. Bunların devamı olarak, bu proje doğmuş ve borun obezite, karaciğer yağlanması ve steatohepatitise etkinliği, lipoprotein alt sınıfları ve nükleer hormon reseptörleri yönünden *'omik'* bir yaklaşımla metabolomik ve transkriptomik olarak değerlendirilmiştir.

Bunun için, yüksek proteinli ve enerjili diyetle beslenen ve bir kontrol ve üç deneme gruplarından oluşan 40 New Zeland dişi tavşan kullanıldı. Deneme gruplarının her birinin 30 mg bor/L dozundaki borlu içme suları, farklı bor bileşiklerinden sağlandı. Üç ay deneme süresini takiben kilo kazanımları, vücut kütle indeksleri, lipid profil ve antioksidan etkinliğe yönelik biyokimyasal parametrelerle birlikte, NMR bazlı metabolomikler ve lipoprotein alt sınıfları ile real time PCR bazlı nükleer hormon reseptörlerinden PPAR ailesi çalışıldı. Karaciğer ve böbrek dokularının histopatolojik analizi yapıldı ve çalışma bor analizleri ile tamamlandı.

Obezite ve karaciğer yağlanmasından daha çok karaciğer hepatositlerinde dejeneratif değişikliklere rastlandı. Biyokimyasal parametrelerden LDL kolesterolün düştüğü, lipid profilde lipoprotein alt sınıflarından küçük LDL partikülleri azalırken küçük HDL ve küçük VLDL partiküllerinde artış belirlenmiştir. Bu değişiklikler susuz boraks ve borik asit gruplarında daha belirgin olmuştur. Metabolomik değerlendirmede asetat, kolin ve tirozin seviyelerinin yine aynı gruplarda artırmıştır. Karaciğerdeki dejeneratif değişikliklerin düzelmesine paralel olarak PPAR-α ve PPAR-β/δ ekspresyonlarının azaldığı ve bu etkinlikte borik asidin öne çıktığı dikkat çekmiştir. Bor seviyeleri, serum ve karaciğerde değişmezken içme suyuna katılan borun bir kısmı dışkıyla atılmıştır.

Sonuç olarak, yüksek proteinli ve enerjili diyet, obezite ve karaciğer yağlanmasından ziyade hepatositlerde dejeneratif değişikliklere yol açmış, bu değişikliklerin içme suyuna bor katkısıyla özellikle borik asit ile düzeldiği gözlenmiştir. Metabolomik ve transkriptomik değerlendirmelerde PPAR-α ve PPAR-β/δ ekspresyonlarının azaldığı, geleneksel lipid parametrelerine göre lipoprotein alt sınıfları seviyelerindeki değişikliklerinin önemli olduğu ve enerji metabolizmasını ilgilendiren bazı metabolitlerin arttığı dikkat çekerken bu etkinliklerde borik asidin öne çıktığı belirlenmiştir. Böylece, bu çalışmayla borla ilgili daha önceki çalışmalarımız daha ileriye taşınmış ve *'omik'* yaklaşımla patojenik mekanizmalar daha iyi anlaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Bor; Karaciğer yağlanması; Lipoprotein alt sınıfları; Nükleer hormon reseptörleri; Obezite

7. SUMMARY

Effects of Boron Compounds on Lipoprotein Subclasses and Nuclear Hormone Receptors in Obese Rabbits

Obesity is a major health problem in human medicine, especially in developed countries. In dogs, incidence of obesity is 24-44% and difficult to treat.

In human hepatic steatosis (fatty live, steatosis) is a fairly common disease and steatohepatitis can cause progressive liver disease including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Fatty liver is also a metabolic disorder affecting the periparturient period in high-producing dairy cows that causes serious economic losses. For this disease in humans, the drugs independent of weight loss, and reducing directly or reversing the liver injury has not been approved yet. The prevention and treatment is similar in dairy cows. They targets protecting from negative energy balance and aiming to minimize the mobilization of fatty acids from adipose tissue.

Boron is our strategic mines provides great advantages in advanced technologies is investigated in the field of health issues related to of human and veterinary medicine, agriculture from various aspects. There are important studies (projects and publications) about the effectiveness of boron regarding health, primarily obesity and fatty liver in our department. As a continuation of them, this project emerged that the effectiveness of boron on obesity and fatty liver devoted to lipoprotein subclasses and nuclear hormone receptors has been evaluated by an 'omics' approach as metabolomic and transcriptomic.

For this, 40 New Zeland rabbits consisted of one control and three experimantal groups fed a high protein and energy diet. Drinking waters containing 30 mg boron/L of each experimental groups were provided from different boron compounds. After three months of experimental duration gains in weight, body mass index, and biochemical parameters for lipid profile and antioxidant activity; NMR-based metabolomics and lipoprotein subclasses; PCR based gluconeogenic enzymes and genes (PPAR family as nuclear hormon receptors) were performed. The work has been completed with boron analysis and histopathological analysis of liver and kidney tissues.

Instead of visceral adiposity and fatty infiltration of the liver degenerative changes in hepatocites were observed. From biochemical parameters decreased LDL cholesterol consantration, from lipoprotein subclasses at lipid profile, decreased small LDL particles, and increased small HDL and small VLDL particles were observed. These alterations were more pronounced in unhydrose boraks and boric acid groups in which acetate, choline and thyrosine consentrations were also increased. Decreased PPAR-α and PPAR-β/δ expressions levels parallel to improvement of degenerative changes were observed in hepotocytes. Boric acide came forward in this efficiency. While boron levels in serum and liver did not vary, boron given in drinking water was not absorbed completely.

As a result, it is observed that high protein and energy diet resulted in more degenerative changes in hepatocytes than obesity and fatty liver, and these changes were improved by boron supplementation (especially boric acid). There were decreased PPAR-α and PPAR-β/δ expression levels, significant alterations in lipoprotein subclasses levels and increased in some metabolites related to energy metabolism in metabolomic and transcriptomic evaluations. Boric acid came forward in this efficiency. Thus, previous studies in our depertmant were advenced and pathogenic mechanisims were better understood by an 'omics' approach.

Key Words: Boron, Fatty liver, Lipoprotein subclasses, Nuclear hormon receptors, Obesity

8. KAYNAKLAR

1. Aiello SE. The Merck Veterinary Manual. 9th edition. Inc. White House Station, NJ, USA, Merck&Co, 2005; 824-26.
2. Akbulut GÇ, Özmen MM, Besler HT. Obezite. Bilim ve Teknik. 2007; 1-15.
3. Akbas F, Aydin Z. Boric acid increases the expression levels of human anion exchanger genes SLC4A2 and SLC4A3. Genetics and Molecular Research. 2012; 11: 847-54.
4. Akinkuolie AO, Paynter NP, Padmanabhan L, Mora S. High-density lipoprotein particle subclass-heterogeneity and incident coronary heart disease. Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2014; 7 (1): 55-63.
5. Alaynick WA. Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism, Mitochondrion. 2008; 8(4): 329-37.
6. Ala- Korpela M. Potential role of body fluid H NMR metabonomics as a prognostic and diagnostic tool. Expert Rev Mol Diagn. 2007; 6: 761-773.
7. Anderson EK, Gutierrez DA, Hasty AH. Adipose tissue recruitment of leukocytes. Curr Opin Lipidol 2010; 21(3): 172-7.
8. Andrade JM, Paraíso AF, de Oliveira MV, Martins AM, Neto JF, Guimarães AL, de Paula AM, Qureshi M, Santos SH. Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. Nutrition. 2014; 30 (7-8): 915-9.
9. Balcı M, Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi, ikinci basım, Ankara, ODTÜ Yayıncılık. 2004; 240-45.
10. Basoglu A, Baspinar N, Ozturk SA, Akalin PP. Effects of long-term boron administrations on high-energy diet-induced obesity in rabbits: NMR-based metabonomic evaluation. J Anim Vet Adv. 2011; 10 (12): 1512-1515.
11. Basoglu A, Baspinar N, Ozturk SA, Akalin PP. Effects of boron administration on hepatic steatosis, hematological and biochemical profiles in obese rabbits. Trace Elements and Electrolytes. 2010; (27): 225-231.
12. Basoglu A, Sevinc M, Birdane M. Boydak M. Efficacy of borax in the prevention of fatty liver in dairy cows. J Vet Intern Med. 2002; 16: 732-5.
13. Basoglu A, Sevinc M, Birdane F, Boydak M. Efficacy of sodium borate in the prevention of fatty liver in dairy cows. J Vet Intern Med. 2002; 16, 6: 732-35.
14. Basoglu A, Sevinc M, Guzelbektas H, Civelek T. Effect of borax on lipid profile in dogs. Online J Vet Res. 2000; 4(6): 153-6.
15. Bays HE, McGovern ME. Once-daily niacin extended release/lovastatin combination tablet has more favorable effects on lipoprotein particle size and subclass distribution than atorvastatin and simvastatin. Prev Cardiol 2003; 6: 179–188.
16. Beyoğlu D, Idle JR (2013) The metabolomic window into hepatobiliary disease. J Hepatol 59 (4): 842-58.
17. Bolanos L, Lukaszewski K, Bonilla I, Blevins D. Why boron? Plant Physiology and Biochemistry. 2004; 42: 907–12.
18. Brown JD, Oligino E, Rader DJ, Saghatelian A, Plutzky J. VLDL hydrolysis by hepatic lipase regulates PPARδ transcriptional responses. Plos One. 2011; 6 (7): e21209.
19. Cali AM,Zern TL, Taksali SE, de Oliveira AM, Dufour S, Otvos J. D, Caprio S. Intrahepatic fat accumulation and alterations in lipoprotein composition in obese adolescents: a perfect proatherogenic state. Diabetes Care. 2007; 30(12): 3093-8.
20. Camacho-Cristobal JJ, Rexach J, Herrera-RodríguezMB, Navarro-Gochicoa MT, González-Fontes A. Boron deficiency and transcript level changes. Plant Sci. 2011; 181(2): 85-9.
21. Carpéné C, Gomez-Zorita S, Deleruyelle S, Carpéné MA. Novel strategies for preventing diabetes and obesity complications with natural polyphenols. Curr Med Chem. 2014 (in press).
22. Carriquiry M, Weber WJ, Fahrenkrug SC, Crooker BA. Hepatic gene expression in multiparous holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. J Dairy Sci. 2009; 92 (10): 4889–900.

23. Casta Neda- Guti'errez E, Pelton SH, Gilbert RO, Butler WR. Effect of peripartum dietary energy supplementation of dairy cows on metabolites, liver function and reproductive variables. Animal Reproduction Science. 2009; 112: 301-315.
24. Celikbilek M, Doğan S. Antioxidant treatment in nonalcoholic fatty liver disease. Turk J Gastroenterol. 2014; 25(4): 468-9.
25. Cecile M, Davide DE, Antonin B, Catherine B, Antoinette L. Non-alcoholic steatohepatitis: new insights from omics studies. Curr Pharm Biotechnol. 2012; 13 (5): 726-35.
26. Choi SS, Park J, Choi JH. PPAR γ as a revisiting target for treatment of metabolic disorders. BMB Rep. 2014; 25: 2934.
27. Coşkun T. Nutrisyonel Genomik, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 2007; 50: 47-66.
28. Collino M, Aragno M, Castiglia S, Miglio G, Tomasinelli C, Boccuzzi G, Thiemermann C, Fantozzi R. Pioglitazone improves lipid and insulin levels in overweight rats on a high cholesterol and fructose diet by decreasing hepatic inflammation. Br J Pharmacol. 2010; 160 (8): 1892-902.
29. Corzo C, Griffin PR. Targeting the peroxisome proliferator-activated receptor-γ to counter the inflammatory milieu in obesity. Diabetes Metab J. 2013; 37 (6): 395-403.
30. Chiang JY. Regulation of bile acid and cholesterol metabolism by PPARs. PPAR Res. 2009; 501739.
31. D'adamo E, Northrup V, Weiss R, Santoro N, Pierpont B, Savoye M, O'Malley G, Caprio S. Ethnic differences in lipoprotein subclasses in obese adolescents: importance of liver and intra abdominal fat accretion. Am J Clin Nutr. 2010; 92 (3): 500-8.
32. Diez M, Nguyen P. The epidemiology of canine and feline obesity. Focus. 2006; 16 (1): 2-8.
33. Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholicfatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2014; 28 (4): 637-653.
34. Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. Frontline Gastroenterol. 20014; 5(4): 277-286.
35. EPA. Toxicological Review of Boron Compounds, U. S. 2001; 7440: 42-8.
36. Fan JG, Cao HX. Role of diet and nutritional management in non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol Hepatol. 2013; 4:81-7.
37. Floretin M, Tselepis AD, Elisaf MS, Rizos CV, Mikhailidis DP, Liberopoulos EN. Effect of non statin lipid lowering and anti-obesity drugs on LDL subfractions in patients with mixed dyslipidaemia. Curr Vasc Pharmacol. 2010; 8(6): 820-30.
38. Fuentes L, Roszer T, Ricote M. Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: role of nuclear receptor signaling in macrophages, mediators of inflammation. Mediators Inflamm. 2010; 219583.
39. Garcia-Caraballo SC, Comhair TM, Verheyen F, Gaemers I, Schaap FG, et al. Prevention and reversal of hepatic steatosis with a high-protein diet in mice. Biochim Biophys Acta. 2013; 1832 (5): 685-95.
40. German A. Clinical risks associated with obesity in companion animals. Focus. 2006; (16)1: 21-6.
41. Giby VG, Ajith TA. Role of adipokines and peroxisome proliferator-activated receptors in non alcoholic fatty liver disease. World J Hepatol. 2014; 27; 6(8): 570-9.
42. Grummerr R. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. Vet J. 2008; 176(1): 10-20.
43. Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications a review. Nutr J. 2014; 14: 13-17.
44. Güler Ç, Çobanoğlu Z. Kimyasallar ve Çevre, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi Ankara No:50. 1997; 20.
45. Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi AV, Reddy JK, Rao MS. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. J Biol Chem. 2000; 275, 28918–28928.
46. Hakki S, Dundar N, Kayis SA, Hakki E, Hamurcu M, Kerimoglu U, Baspinar N, Basoglu A, Nielsen FH. Boron enhances strength and alters mineral composition of bone in rabbits fed a high energy diet. J Trace Elem MedBiol. 2013; 27: 148-53.

47. Hardwick JP, Osei-Hyiaman D, Wiland H, Abdelmegeed MA, Song BJ. PPAR/RAAXR regulation of fatty acid metabolism and fatty acid ω-hydroxylase (CYP4) isozymes: implications for prevention of lipotoxicity in fatty liver disease. PPAR Res. 2009; 952734.
48. Helvacı C. Türkiye borat yatakları: jeolojik konumu, ekonomik önemi ve bor politikası, 5.Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, Mayıs, İzmir. 2004; pp: 11-27.
49. Heindel JJ, Price JC, Schwetz AB. The developmental toxicity of boric acid in mice, rats, and rabbits. Environ Health Perspect.1994; 102 (7):107-112.
50. Hodge AM, Jenkins AJ, English DR, O'Dea K, Giles GG. NMR-determined lipoprotein subclassprofile is associated with dietary composition and body size. Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases. 2011; 21, (8): 603-9.
51. Hodge AM, Jenkins AJ, English DR, O'Dea K, Giles GG. NMR-determined lipoprotein subclass profile predicts type 2 diabetes. Diabetes Research and Clinical Practice. 2009; 83: 132–9.
52. Hunt CD. Dietary boron: progress in establishing essential roles in human physiology. J Trace Elem Med Biol. 2012; 226 (2-3): 157-60.
53. Ingvartsen KL. Feeding and management-related diseases in the transient cow phisiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. Animal Feed Science and Technology. 2006; 126 (3-4): 175-213.
54. Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD. Lipoprotein particle analysis by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Clin Lab Med. 2006; 26(4): 847-70.
55. Jozefczuk J, Kashofer K, Ummanni, Henjes F, Rehman S, Geenen S, Wruck W, Regenbrecht C, Daskalaki A, Wierling C, Turano P, Bertini I, Korf U, Zatloukal K, Westerhoff HV, Lehrach H, Adjaye J. A systems biology approach to deciphering the etiology of steatosis employing patient derived dermal fibroblasts and IPS cells. Front Physiol. 2012; 3: 339.
56. Kawai T, Ho T, Ohwada K, Mıra Y, Matshushita M, Tomoike H. Hereditery post prandial hypertrigliseridemic rabbit exhibits insülin resistence and control obesity a novel model of metabolic syndrome. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; Dec: 26 (12) 2752-7.
57. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, Milburn M. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. Metabolism. 2011; 60 (3): 404-13.
58. Kallwitz ER, Mc Lachlan A, Cotler SJ. Role of peroxisome proliferators-activated receptors in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2008; 14 (1): 22-28.
59. Kersten S. Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. Eur J Pharmacol. 2002; 440 (2-3): 223-34.
60. Khan MJ, Jacometo CB, Graugnard DE, Corrêa MN, Schmitt E, Cardoso F, Loor JJ. Overfeeding dairy cattle during Late-pregnancy alters hepatic PPARα-regulated pathways including hepatokines: Impact on metabolism and peripheral insulin sensitivity. Gene Regul Syst Bio. 2014 Apr 3; 8: 97-111.
61. Kirpich IA, Gobejishvili LN, Homme MB, Waigel S, Cave M, Arteel G, Barve SS, McClain CJ, Deaciuc IV. Integrated hepatic transcriptome and proteome analysis of mice with high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease. Journal of Nutritional Biochemistry. 2011; 22: 38–45.
62. Knobler H, Elson A. Metabolic regulation by protein tyrosine phosphatases. J Biomed Res. 2014; 28 (3): 157-68.
63. Kurar E, Atli MO, Guzeloglu A, Ozsensoy Y, Semacan A. Comparison of five different RNA isolation methods from equine endometrium for gene transcription analysis. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2010; 16: 851–5.
64. Lacroix M, Gaudichon C, Martin A, Morens C, Mathe V, et al. A long term high protein diet markedly reduces adipose tissue without major side effects in Wistar male rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004; 287: R934– 942.
65. Li H, Wang L, Yan X, Liu Q, Yu C, et al. A proton nuclear magnetic resonance metabonomics approach for biomarker discovery in nonalcoholic fatty liver disease. J Proteome Res 2011; 10: 2797–2806.
66. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta C(T)) Method Methods. 2001; 25(4): 402-8.

67. Lopez-Velazquez JA, Carrillo-Córdova LD, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Nuclear receptors in nonalcoholic fatty liver disease. J Lipids. 2012; 139875.

68. Mallol R, Rodriguez MA, Brezmes J, Masana L, Correig X. Human serum/plasma lipoprotein analysis by NMR: application to the study of diabetic dyslipidemia. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. 2013; 70: 1-24.

69. Martel C, Esposti DD, Bouchet A, Brenner C, Lemoine A. Non-alcoholic steatohepatitis: new insights from omics studies. Curr Pharm Biotechnol. 2012; 13 (5): 726-35.

70. Männistö VT, Simonen M, Soininen P, Tiainen M, Kangas AJ, Kaminska D, Venesmaa S, Käkelä P, Kärjä V, Gylling H, Ala-Korpela M, Pihlajamäki J. Lipoprotein subclass metabolism in non-alcoholic steatohepatitis. J Lipid Res. 2014; 24. pii: jlr. P054387.

71. Meng Q, Mäkinen VP, Luk H, Yang X. Systems biology approaches and applications in obesity, diabetes, and cardiovascular diseases. Curr Cardiovasc Risk Rep. 2013; 7(1): 73-83.

72. Michos ED, Sibley CT, Baer JT, Blaha MJ. Blumenthal RS: Niacin and statin combination therapy for atherosclerosis regression and prevention of cardiovascular disease events: reconciling the AIM-HIGH (Atherothrombosis intervention in metabolic syndrome with low HDL/High triglycerides: impact on global health outcomes) trial with previous surrogate end point trials. J Am Coll Cardiol. 2012; 59: 2058–2064.

73. Mukesh M, Bionaz M, Graugnard DE, Drackley JK, Loor JJ. Adipose tissue depots of holstein cows are immune responsive: Inflammatory gene expression in vitro. Domestic Animal Endocrinology. 2010; 38: 168–178.

74. Mulligan FJ, Doherty ML. Production diseases of the transition cow. The Veterinary Journal. 2008; 176:3–9.

75. Neels JG, Grimaldi PA. Physiological functions of peroxisome proliferator-activated receptor β. Physiol Rev. 2014; 94(3): 795-858.

76. Nikolic D, Katsiki N, Montalto G, Isenovic ER, Mikhailidis DP, Rizzo M. Nutrients. 2013; 18; 5(3): 928-48.

77. Nielsen FH. Update on human health effects of boron. J Trace Elem Med Biol. 2014; pp: S0946-672X (14) 00128-X.

78. Nielsen FH. Boron deprivation decreases liver S-adenosylmethionine and spermidine and increases plasma homocysteine and cysteine in rats. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2009; 23: 204–213.

79. Nunes PM, Jones JG, Rolo AP, Palmeira CM, Carvalho RA. Ursodeoxycholic acid treatment of hepatic steatosis: a (13) C NMR metabolic study. NMR Biomed. 2011; 24(9): 1145-58.

80. Ordovás Muñoz JM. Predictors of obesity: the "power" of the omics. Nutr Hosp. 2013; 5: 63-71.

81. Pahl VM, Culver DB, Vaziri DN. Boron and the kidney. Journal of Renal Nutrition. 2005; 15 (4): 362-370.

82. Palin, Petit. Effects of polyunsaturated fatty acids on hepatic PPARα mRNA levels in the transition cow. J Anim Feed Sci Polish Acad Sci. 2004; 13 (suppl 1): 445–8.

83. Pan J, Shilian P, Ishida B, Wu X, Kane JP, Malloy MJ, Charles MA: Effect of niacin on pre beta-1 high-density lipoprotein levels in diabetes. Metabolism. 2011; 60: 292–297.

84. Pawa S, Ali S. Boron ameliorates fulminant hepatic failure by counteracting the changes associated with the oxidative stress. Chem Biol Interact. 2006; 160 (2): 89-98.

85. Phillips MC. New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins: Thematic review series: high density lipoprotein structure, function, and metabolism. J Lipid Res. 2013; 54 (8): 2034-48.

86. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. High-density lipoprotein subfractions what the clinicians need to know. Cardiology. 2013; 124 (2): 116-25.

87. Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPAR alpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. Nucl Recept Signal. 2010; 16 (8): 002.

88. Rauschert S, Uhl O, Koletzko B, Hellmuth C. Metabolomic biomarkers for obesity in humans: a short review. Ann NutrMetab. 2014; 64 (3-4): 314-24.

89. Roberts LD, Hassall DG, Winegar DA, Haselden JN, Nicholls AW, Griffin JL. Increased hepatic oxidative metabolism distinguishes the action of Peroxisome proliferator-activated receptor

delta from peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the ob/ob mouse. Genome Med. 2009; 1 (12):115.

90. Ryu SL, Shim JW, Kim DS, Jung HL, Park MS, Park SH, Lee J, Lee WY, Shim JY. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-α and (PPAR)-γ in the lung tissue of obese mice and the effect of rosiglitazone on proinflammatory cytokine expressions in the lung tissue. Korean J Pediatr. 2013; 56 (4): 151-8.
91. Sabaka P, Kruzliak P, Gaspar L, Caprnda M, Bendzala M, Balaz D, Oravec S, Dukat A. Postprandial changes of lipoprotein profile: effect of abdominal obesity. Lipids Health Dis. 2013; 8; 12: 179.
92. Sabuncuoglu BT, Kocaturk PA, Yaman O, Kavas GO, Tekelioglu M. Effects of subacute boric acid administration on rat kidney tissue. Clin Toxicol. 2006; 44 (3): 249-53.
93. Sakai T, Kamanna VS, Kashyap ML. Niacin, but not gemfibrozil, selectively increases LPAI, a cardioprotective subfraction of HDL, in patients with low HDL cholesterol. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21: 1783–1789.
94. Sattar N, Forrest E, Preiss D. Non-alcoholic fatty liver disease. BMJ. 2014; 29; 349: 4596.
95. Savorani F, Kristensen M, Larsen FH, Astrup A, Engelsen SB. High throughput prediction of chylomicron triglycerides in human plasma by nuclear magnetic resonance and chemometrics. Nutrition and Metabolism. 2010; 14 (7): 43.
96. Schmid AI, Szendroedi J, Chmelik M, Krssák M, Moser E, Roden M. Liver ATP synthesis is lower and relates to insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2011; 34 (2): 448-53.
97. Schreuder T, Bart J, Verwer BJ, Van Nieuwkerk CMJ, Mulder CJJ. Nonalcoholic fatty liver disease: An overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment. World J Gastroenterol. 2008; 28, 14 (16): 2474-86.
98. Schwarz J, Tomé D, Baars A, Hooiveld GJ, Müller M. Dietary protein affects gene expression and prevents lipid accumulation in the liver in mice. PLoS One. 2012; 7 (10): e47303.
99. Seedorf U, Aberle J. Emerging roles of PPAR delta in metabolism. Biochim Biophys Acta. 2007; 1771 (9): 1125-31.
100. Serkova NJ, Jackman M, Brown JL, Liu T, Hirose R.Roberts JP, Maher JJ, Nieman CU. Metabolic profiling of livers and blood from obese Zucker rats. Journal of Hepatology. 2006; 44: 956–962.
101. Sevinc M, Basoglu A, Birdane FM, Boydak M. Liver function in dairy cows with fatty liver. Revue Méd Vét. 2001; 152: 4, 279-300.
102. Sevinc M, Basoglu A, Ok M. Fatty liver in periparturient diseases of dairy cows. Indian Vet J. 2002; 79: 1285-1287.
103. Sevinc M, Basoglu A, Guzelbektas H, Boydak M. Lipid and lipoprotein levels in dairy cows with fatty liver. Turk J Vet Anim Sci. 2003; 27:295-299.
104. Sevinc M, Basoglu A, Ok M, Birdane FM. The assessment of liver function in cows withs pontanous ketosis. Indian Vet J. 2004; 81: 506-510.
105. Shearer J, Duggan G, Weljie A, Hittel DS, Wasserman DH, Vogel HJ. Metabolomic profiling of dietary-induced insulin resistance in the high fat-fed C57BL/6J Mouse. Diabetes Obes Metab. 2008; 10(10): 950-8.
106. Shertzer HG, Woods SE, Krishan M, Genter MB, Pearson KJ. Dietary whey protein lowers the risk for metabolic disease in mice fed a high-fat diet. Nutr. 2011; 141: 582–587.
107. Tailleux A, Wouters K, Staels B. Roles of PPARs in NAFLD potential therapeutic targets. Biochim Biophys Acta. 2012; 1821 (5): 809-18.
108. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. World J Gastroenterol. 21 May 2012; 18 (19): 2300-8.
109. Terashima Y, Nishiumi S, Minami A, Kawano Y, Hoshi N, et al. Metabolomics-based search for therapeutic agents for non-alcoholic steatohepatitis. Arch Biochem Biophys. 2014; 555-556: 55-65.
110. Tirosh O. Liver Metabolism And Fatty Liver Disease, CRC PressTaylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton: FL, 2014; 33487-2742.

111. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. J Adv Pharm Technol Res. 2011; 2 (4): 236-40.

112. Ueland PM. Choline and betaine in health and disease. J Inherit Metab Dis. 2011; 34 (1): 3-15.

113. Vallim T, Salter AM. Regulation of hepatic gene expression by saturated fatty acids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2010; 82 (4-6): 211-8.

114. Van Doorn M,Vogels J, Tas A, Van Hoogdalem EJ, Burggraaf J, Cohen A, Van Der Greef J. Evaluation of metabolite profiles as biomarkers for the pharmacological effects of thiazolidinediones in Type 2 diabetes mellitus patients and healthy volunteers. Br J Clin Pharmacol. 2007; 63(5): 562-74.

115. Vinaixa M, Rodríguez MA, Rull A, Beltrán R. Bladé C, Brezmes J, Cañellas N, Joven J, Correig X. Metabolomic assessment of the effect of dietary cholesterol in the progressive development of fatty liver disease. J Proteome Res. 2010; 7,9 (5): 2527-38.

116. Yasutake K, Kohjima M, Nakashima M, Kotoh K, Nakamuta M, et al. Nutrition therapy for liver diseases based on the status of nutritional intake. Gastroenterol Res Pract. 2012; 859697.

117. WHO (World Health Organization). Environmental Health Criteria 204: Boron international programme on chemical safety, Genewa. ISBN 92 4 157204 3, Switzerland. 1998; Pp: 105.

118. Wierzbicki M, Chabowski A, Zendzian-Piotrowska M, Harasim E, Górski J. Chronic, in vivo, PPAR alpha activation prevents lipid overload in rat liver induced by high fat feeding. Adv Med Sci. 2009; 54 (1): 59-65.

119. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. Amino Acids. 2009: 37: 1–17.

120. Xie Z, Li H, Wang K, Lin J, Wang Q, Zhao G, Jia W, Zhang Q. Analysis of transcriptome and metabolome profiles alterations in fatty liver induced by high-fat diet in rat. Metabolism Clinical and Experimental. 2010; 59: 554-560.

121. Zafar H, Ali S. Boron inhibits the proliferating cell nuclear antigen index, molybdenum containing proteins and ameliorates oxidative stress in hepatocellular carcinoma. Arch Biochem Biophys. 2013; 15, 529 (2): 66-74.

122. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. J Proteomics. 2012; 2, 75 (4): 1079-88.

123. Zhao X, Xiaoli, Zong H, Abdulla A, Yang ES, Wang Q, Ji JY, Pessin JE, Das BC, Yang F. Inhibition of SREBP transcriptional activity by a boron-containing compound improves lipid homeostasis in diet-induced obesity. Diabetes. 2014; 63 (7): 2464-73.

124. Zou C, Qi H, Liu Z, Han L, Zhao C, Yang X. Simvastatin activates the PPARγ-dependent pathway to prevent left ventricular hypertrophy associated with inhibition of RhoA signaling. Tex Heart Inst J. 2013; 40 (2): 140–147.

10. ÖZGEÇMİŞ

Özgür YAMAN, 03.01.1981 tarihinde Isparta'nın Şarkikaraağaç ilçesinde dünyaya geldi. Öğrenim hayatına Fethiye Atatürk İlköğretim Okulu'nda başladı. Ortaokulu Ankara Anadolu Lisesi'nde, lise eğitimini ise 1998 yılında Fethiye Lisesi'nde tamamladı. 1999 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde üniversite öğrenimine başladı. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda doktora öğrenimine başladı.