



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**FRUKTOZ İLE İNDÜKLENEN ALKOLİK
OLMAYAN KARACİĞER YAĞLANMASI OLAN
SIÇANLARDA PROBİYOTİK DESTEĞİNİN
SİRKADİYEN SAAT ÜZERİNE ETKİSİ**

AYFER BEYAZ COŞKUN

BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI

KASIM 2021



**FRUKTOZ İLE İNDÜKLENEN ALKOLİK OLMAYAN KARACİĞER
YAĞLANMASI OLAN SIÇANLARDA PROBİYOTİK DESTEĞİNİN
SİRKADİYEN SAAT ÜZERİNE ETKİSİ**

Ayfer BEYAZ COŞKUN

**DOKTORA TEZİ
BESLENME VE DİYETETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ayfer BEYAZ COŞKUN
26.11.2021

FRUKTOZ İLE İNDÜKLENEN ALKOLİK OLMAYAN KARACİĞER YAĞLANMASI OLAN SIÇANLARDA PROBİYOTİK DESTEĞİNİN SİRKADİYEN SAAT ÜZERİNE ETKİSİ

(Doktora Tezi)

Ayfer BEYAZ COŞKUN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kasım 2021

ÖZET

Bu çalışma, sıçanlarda alkolik olmayan karaciğer yağlanması modeli oluşturarak, bağırsak mikrobiyotası – karaciğer eksenini kullanarak, bağırsağa yapılan bir müdahale ile hepatositlerdeki sirkadiyen saati yeniden programlayarak metabolik bozukluğu iyileştirmek amacıyla planlanıp yürütülmüştür. Çalışmaya 27 adet Wistar albino türü erkek sıçanlar alınmış ve çalışma başlangıcında ortalama ağırlıkları 150 g (95-177) olarak belirlenmiştir. Sıçanlar daha sonra 3 gruba ayrılarak, 13 hafta süre ile standart yem + standart su [1.grup (n:8)] ve standart yem + fruktozlu su [2.grup (n:11) ve 3.grup (n:8)] ile beslenmişlerdir. Yedi hafta sonrasında 2.gruptan 3 sıçan kesilerek patolojik bulgular ile karaciğer yağlanması olduğu tespit edilince 3.gruptaki sıçanlara 6 haftalık 2×10^9 cfu/gün *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) takviyesine başlanmıştır ve diğer grupların aynı şekilde beslenmesine devam edilmiştir. Sıçanların su ve besin tüketimleri, vücut ağırlıkları, boy uzunlukları ve bel çevresi ölçümleri, biyokimyasal bulguları (total kolesterol, GGT, glikoz, ALT, AST, IL-6, IL-1 β , zonulin, glutatyon, süperoksit dismutaz, malondialdehit ve glutatyon peroksidaz), hormon (melatonin ve insülin) ve sirkadiyen saat genlerinin (Bmal1, Clock, Rev-Erba ve Per2) mRNA ekspresyon düzeyleri ve karaciğerin histopatolojik değerlendirmesi yapılmıştır. YFD grubunun NAS skoru (5,00) kontrol grubu (0,00) ve YFD+probiyotik grubundan (3,00) anlamlı olarak yüksek çıkmıştır ($p < 0,05$). Kontrol grubuna göre (%2,51) YFD grubunun karaciğer indeksi (%3,53) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur, LGG uygulaması ise bu değeri düşürmüştür (%3,01). Zonulin seviyesi ve sirkadiyen saat genlerinin ekspresyon düzeyleri için gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ancak fruktoz tüketimi sirkadiyen saat gen düzeylerini yükseltmiş, LGG ise bu etkiyi azaltmıştır. Melatonin değeri Clock ($r = -0,431$; $p = 0,035$), Rev-Erba ($r = -0,450$; $p = 0,027$) ve Per2 ($r = -0,410$; $p = 0,045$) genleri ile negatif korelasyon göstermiştir. MDA düzeyi YFD (8,49 nmol/mL) ve YFD+probiyotik grubunda (8,29 nmol/mL), kontrol grubundan (5,56 nmol/mL) yüksek çıkmıştır. LGG müdahalesi fizyolojik parametrelerde iyileşmelere neden olmuştur. Fruktoz kullanımı oksidatif stresi arttırmakta, LGG kullanımı ise oksidatif stresi azaltmakta ve yıkım daha az gözlenmektedir. Sirkadiyen saat gen düzeyleri YFD grubunda olduğu gibi hasar durumunda yükselmektedir ve LGG kullanımı ile bu düzeyler azalmaktadır. Melatonin değerinin düşmesi sirkadiyen saat gen düzeylerinin artmasına sebep olmaktadır. İleriki çalışmalarda bağırsak geçirgenliğinin artmasını sağlamak için sıçanlara yüksek fruktoz ile birlikte yüksek yağlı bir diyet uygulanması veya deney süresinin uzatılması veya farklı suşların denenmesi; genlerin mRNA düzeylerinin yanısıra sirkadiyen saat lokomotor aktivite testinin de yapılması önerilmektedir. Ayrıca tedavi yaklaşımları olarak en uygun probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik türlerinin belirlenmesine yönelik araştırmaların denenmesi önerilmektedir.

Bilim Kodu : 1007

Anahtar Kelimeler : Alkolik olmayan karaciğer yağlanması, Sirkadiyen saat, Probiyotik, Bağırsak karaciğer eksen

Sayfa Adedi : 219

Danışman : Prof. Dr. A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

İkinci Danışman : Doç. Dr. Semra TÜRKOĞLU

THE EFFECT OF PROBIOTIC SUPPLEMENTATION ON CIRCADIAN CLOCK IN RATS WITH FRUCTOSE-INDUCED NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE

(Ph. D. Thesis)

Ayfer BEYAZ COŞKUN

GAZI UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

November 2021

ABSTRACT

This study was conducted and planned in order to improve metabolic disorder by reprogramming the circadian clock in hepatocytes with an intervention in the intestine, using the gut microbiota-liver axis, by creating a non-alcoholic fatty liver model in rats. Twenty-seven Wistar-albino male rats were included in the study and their average weight was determined as 150 g (95-177) at the beginning of the study. The rats were then divided into 3 groups, standard feed+standard water [1. group (n:8)] and standard feed+fructose water [2. group (n:11) and 3. group (n:8)] for 13 weeks] were fed. After seven weeks, 3 rats from the 2nd group were slaughtered and when it was determined that liver fat was formed with pathological findings, 6-week probiotic supplementation with 2×10^9 cfu/day *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) was started to the rats in the 3rd group and the other groups continued to be fed in the same way. The rats' fluid and food consumption, body weight, height and waist circumference measurements, biochemical findings (total cholesterol, GGT, LDH, ALT, AST, IL-6, IL-1 β , zonulin, glutathione, superoxide dismutase, malondialdehyde and glutathione peroxidase), hormone (melatonin and insulin) and circadian clock gene levels (Bmal1, Clock, Rev-Erba and Per2), and histopathological evaluation of the liver were performed. As a result of the study, NAS score of the YFD group (5,00) was significantly higher than the control group (0,00) and the YFD+probiotic group (3,00) ($p < 0.05$). Compared to the control group (2,51%), the liver index of the YFD group (3,53%) was found to be significantly higher, while LGG supplementation decreased this value (3,01%). There was no significant difference between the groups for zonulin level and mRNA expression levels of circadian clock genes ($p > 0,05$). However, fructose consumption increased circadian clock gene levels, while LGG reduced this effect. Melatonin levels were negatively correlated with Clock ($r = -0.431$; $p = 0.035$), Rev-Erba ($r = -0.450$; $p = 0.027$) and Per2 ($r = -0.410$; $p = 0.045$) genes. The MDA level was higher in the YFD (8,49 nmol/mL) and YFD+probiotic group (8,29 nmol/mL) than the control group (5,56 nmol/mL). LGG supplementation resulted in improvements in physiological parameters. The use of fructose increases oxidative stress, while the use of LGG reduces oxidative stress and destruction is observed less. Circadian clock gene levels increase in case of damage as in the YFD group, and these levels decrease with the use of LGG. The decrease in melatonin value causes an increase in circadian clock gene levels. In order to increase intestinal permeability in future studies, administering a high-fat diet with high fructose to rats or extending the experimental period or trying different strains; It is recommended to perform circadian clock locomotor activity test as well as mRNA levels of genes. In addition, it is recommended to try researches to determine the most sustainable probiotic, prebiotic and symbiotic species as treatment approaches.

Science Code : 1007

Key Words : Non-alcoholic fatty liver disease, Circadian clock, Probiotic, Gut liver axis

Page Number : 219

Supervisor : Prof. Dr. A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Semra TÜRKOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmanın yürütülmesi ve planlanmasında bana yol gösteren, sabrını, desteğini ve kıymetli vaktini esirgemeyen tez danışmanım Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU CELEP'e ve ikinci danışmanım Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Semra TÜRKOĞLU'na,

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nde bulunan bütün değerli hocalarıma,

Tezimde patolojik incelemelerde bulunan Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN'a ve deney süresince desteğini esirgemeyen İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları biriminde çalışan veteriner Engin KORKMAZ ve biyolog Asiye BEYTUR'a,

Her zaman yanımda olan ve desteklerini hiç esirgemeyen canım ailem; sevgili annem Ayşe BEYAZ, sevgili babam Hayrettin BEYAZ ve sevgili kardeşlerim Ömer Faruk BEYAZ ve Ferhat BEYAZ'a,

Hayatımda olduğu günden beri daima sevgimi ve üzüntümü önyargısız paylaşabildiğim yol arkadaşım, kıymetli eşim Emrah COŞKUN'a,

Doğduğuna her gün şükrettiğim, her duamda ve her günümde onu düşündüğüm, geleceğimin huzur mimarı, umut kaynağım, güzel yürekli ve sevgi dolu kızım Amine COŞKUN'a

Kalpten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SYO.21.04 proje kodu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xv
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Karaciğer Hastalıkları	5
2.1.1. Alkolik olmayan karaciğer yağlanması	5
2.1.2. Alkolik olmayan steatohepatit	5
2.1.3. Alkolik steatohepatit.....	6
2.1.4. Alkolik karaciğer hastalığı.....	6
2.1.5. Hepatik ensefalopati ve spontan bakteriyel peritonit	7
2.1.6. Hepatoselüler karsinoma	7
2.1.7. Hepatit B virüs enfeksiyonu	7
2.1.8. Hepatit C virüs enfeksiyonu	8
2.1.9. Karaciğer sirozu.....	8
2.2. Alkolik Olmayan Karaciğer Yağlanması	8
2.2.1. Epidemiyolojisi.....	8
2.2.2. Etiyolojisi.....	9
2.2.3. Patogenezi	10
2.2.4. Klinik belirtiler ve laboratuvar bulguları.....	22
2.2.5. Tanı kriterleri.....	23

Sayfa

2.2.6. Histopatolojik bulgular	29
2.2.7. Bağırsak mikrobiyotası ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığındaki rolü	33
2.2.8. Tedavi yöntemleri.....	40
2.3. Alkolik Olmayan Karaciğer Yağlanması İyileştirmede Bağırsak Modülasyonu Yöntemi: Probiyotikler	48
2.3.1. Probiyotiklerin tanımı ve türleri	48
2.3.2. Probiyotiklerin etki mekanizması ve bağırsak mikrobiyotası ve alkolik olmayan karaciğer yağlanması ile ilişkisi	49
2.3.3. Alkolik olmayan karaciğer yağlanmasında probiyotiklerin güvenilirliği.....	50
2.4. Karaciğer Hastalıklarını İyileştirmede Diğer Bağırsak Modülasyonu Yöntemleri..	51
2.4.1. Prebiyotikler	51
2.4.2. Sinbiyotikler	52
2.4.3. Antibiyotikler.....	53
2.4.4. Safra asidi regülasyonu.....	54
2.4.5. Adsorbanlar	55
2.4.6. Fekal mikrobiyota transplantasyonu.....	55
2.5. Sirkadiyen Ritim	56
2.5.1. Merkezi ve çevresel sirkadiyen saatler	59
2.5.2. Sirkadiyen ritmi etkileyen faktörler.....	60
2.5.3. Karaciğerin sirkadiyen saati ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı ilişkisi.....	67
2.5.4. Sirkadiyen ritim ve metabolik sendrom.....	69
2.5.5. Sirkadiyen ritim bozuklukları, bağırsak mikrobiyotası ve beslenme ilişkisi..	72
2.5.6. Sirkadiyen ritim tedavisi.....	73
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	77
3.1. Araştırma Yeri, Zamanı ve Örneklem Seçimi.....	77
3.2. Etik Kurul İzni.....	77

Sayfa

3.3. Deney Hayvanlarının Seçimi	77
3.4. Deney Grupları ve Besin Desteği	78
3.5. Verilerin Toplanması ve Ölçüm Yöntemleri.....	82
3.5.1. Sıvı ve yem tüketimi ile enerji alım hesabı	84
3.5.2. Fizyolojik parametreler.....	84
3.5.3. Biyokimyasal parametreler	85
3.5.4. Karaciğer dokusunda yapılan incelemeler.....	87
3.5.5. Histopatolojik örneklemelerin incelenmesi.....	95
3.6. Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi.....	100
4. BULGULAR	103
4.1. Sıçanların Yem ve Su Tüketim Durumları ile Enerji Alım Miktarları	103
4.2. Sıçanların Vücut Ağırlıklarındaki ve Boy Uzunluklarındaki Değişimler	107
4.3. Sıçanların Beden Kütle İndeksleri, Lee İndeksleri ve Bel Çevrelerindeki Değişimler.....	110
4.4. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Sıvı ve Yem Tüketimi ile Lee İndeksi ve Bel Çevresi Arasındaki Korelasyon	111
4.5. Sıçanların Karaciğer Ağırlıklarındaki Değişimler	111
4.6. Histopatolojik Değerlendirme	112
4.7. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Biyokimyasal Bulguları	113
4.8. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre İnflamatuvar Belirteç ve Hormon Düzeyleri.....	114
4.9. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Serum Zonulin Düzeyleri.....	115
4.10. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Oksidatif Stres ve Antioksidan Enzim Düzeyleri	115
4.11. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Sirkadiyen Saat Gen Düzeyleri.....	116
4.12. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Serum Zonulin Düzeyi ile İnflamatuvar Belirteçler, Hormon Düzeyleri, Biyokimyasal Bulgular, Lee İndeksi, Antioksidan Durum ve Sirkadiyen Gen Düzeyleri Arasındaki İlişki	117

Sayfa

4.13. Sıçanların Sirkadiyen Saat Gen Ekspresyon Seviyeleri ile Karaciğer Organ Ağırlığı, Lee İndeksi, Oksidatif Stres Durumu, Biyokimyasal Bulgular, İnflamatuvar Belirteçler ve Hormon Değerleri Arasındaki İlişki	119
5. TARTIŞMA	125
5.1. Sıçanların Yem ve Su Tüketim Durumları ile Enerji Alım Miktarları	126
5.2. Sıçanların Vücut Ağırlıklarındaki ve Boy Uzunluklarındaki Değişimler	127
5.3. Sıçanların Beden Kütle İndeksleri, Lee İndeksleri ve Bel Çevrelerindeki Değişimler.....	128
5.4. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Sıvı ve Yem Tüketimi ile Lee İndeksi ve Bel Çevresi Arasındaki Korelasyon	130
5.5. Sıçanların Karaciğer Ağırlıklarındaki Değişimler	130
5.6. Histopatolojik Değerlendirme	131
5.7. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Biyokimyasal Bulguları	132
5.8. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre İnflamatuvar Belirteç ve Hormon Düzeyleri.....	134
5.9. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Serum Zonulin Düzeyleri.....	137
5.10. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Oksidatif Stres ve Antioksidan Enzim Düzeyleri	138
5.11. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Sirkadiyen Saat Gen Düzeyleri.....	140
5.12. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Serum Zonulin Düzeyi ile Biyokimyasal Bulgular, İnflamatuvar Belirteçler, Antioksidan Durum, Hormon Düzeyleri ve Sirkadiyen Ritim Gen Düzeyleri Arasındaki İlişki	142
5.13. Sıçanların Sirkadiyen Saat Gen Düzeyleri ile Karaciğer Organ Ağırlığı, Lee İndeksi, Oksidatif Stres Durumu, Biyokimyasal Bulgular, İnflamatuvar Belirteçler ve Hormon Değerleri Arasındaki İlişki	145
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	151
KAYNAKLAR	157
EKLER.....	215
EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi	216
EK-2. Standart Yemin Diyet Örüntüsü	217
EK-3. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	218

Sayfa

EK-4. Turnitin Tez Benzerlik Raporu 219

ÖZGEÇMİŞ.....220



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. NAYKH tanısında kullanılan biyobelirteçler ve görüntüleme teknikleri.....	24
Çizelge 2.2. Fibrozis derecesi (evreleme).....	29
Çizelge 2.3. Brunt sınıflaması bileşenleri	30
Çizelge 2.4. NASH aktivite derecelendirmesi	30
Çizelge 2.5. Alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalığında karaciğer biyopsisini değerlendirmek için SAF skormala sistemi.....	32
Çizelge 2.6. Alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalığında karaciğer biyopsisini değerlendirmek için Matteoni sınıflaması.....	33
Çizelge 2.7. Alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalığında karaciğer biyopsisini değerlendirmek için Mendler sınıflaması	33
Çizelge 2.8. Rehberler doğrultusunda alkolik olmayan karaciğer yağlanması için diyetsel öneriler	43
Çizelge 2.9. Rehberler doğrultusunda alkolik olmayan karaciğer yağlanması için fiziksel aktivite önerileri	46
Çizelge 3.1. Gen ekspresyon metodu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ Livak Metodu).....	89
Çizelge 3.2. Gen ekspresyon primer tasarım ve bağlanma sıcaklıkları	92
Çizelge 3.3. Enzim inaktivasyonu	93
Çizelge 3.4. Soğuk blok üzerinde hazırlanan bileşenler	93
Çizelge 3.5. Termal döngüleyici prosedürü.....	93
Çizelge 3.6. Tasarım kontrol listesi	94
Çizelge 3.7. Numune Bilgileri ve qPCR Ct Mean Sonuçları.....	95
Çizelge 3.8. Numunelere Ait Katsayı Değişimleri (Fold Change)	97
Çizelge 3.9. Alkolik olmayam yağlı karaciğer biyopsisini değerlendirmek için NAS skortlama sistemi	100
Çizelge 4.1. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre günlük ortalama yem tüketim miktarları (g/gün).....	103
Çizelge 4.2. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre günlük ortalama su tüketim miktarları (mL/gün)	105

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.3. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre günlük ortalama enerji alım miktarları (kkal/gün)	106
Çizelge 4.4. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre deneyin başlangıcı, 7.hafta ve 13.hafta vücut ağırlıkları (g)	107
Çizelge 4.5. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre vücut ağırlığı değişimleri (%)....	108
Çizelge 4.6. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre deneyin başlangıcı, 7.hafta ve 13.hafta boy uzunlukları (cm).....	109
Çizelge 4.7. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre boy uzunluğu değişimleri (%) ...	110
Çizelge 4.8. Sıçanların deney başlangıcında, deneyin 7.haftasında ve deney 13. haftasında gruplar arası antropometrik ölçümlerinin değerlendirilmesi	110
Çizelge 4.9. Sıçanların sıvı ve yem tüketimleri, lee indeksleri ve bel çevreleri arasındaki ilişki	111
Çizelge 4.10. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre karaciğer ağırlıkları ve karaciğer indekslerinin değerlendirilmesi.....	112
Çizelge 4.11. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre karaciğer dokusu yağlanma düzeyleri.....	113
Çizelge 4.12. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre biyokimyasal parametre düzeyleri.....	114
Çizelge 4.13. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre inflamatuvar belirteç ve hormon düzeyleri	114
Çizelge 4.14. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre zonulin düzeyleri.....	115
Çizelge 4.15. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre oksidatif stres parametrelerinin düzeyleri.....	116
Çizelge 4.16. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Clock, Bmal1, Rev-Erba ve Per2 gen ekspresyon düzeyleri.....	116
Çizelge 4.17. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre serum zonulin düzeyi ile inflamatuvar belirteçler, hormon düzeyleri, biyokimyasal parametreler, Lee indeksi, oksidatif stres düzeyleri ile sirkadiyen saat genlerinin ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki.....	118
Çizelge 4.18. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Clock gen ekspresyon seviyesi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki ilişki.....	120

Çizelge**Sayfa**

Çizelge 4.18. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Clock gen ekspresyon seviyesi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki ilişki.....120

Çizelge 4.19. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Bmal1 gen ekspresyon seviyesi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki ilişki.....121

Çizelge 4.20. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki ilişki.....122

Çizelge 4.21. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Per2 gen ekspresyon seviyesi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki ilişki.....122

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Erkeklerde alkolik olmayan karaciğer yağlanması patofizyolojisinde bağırsak ve fonksiyonel olmayan yağ dokusunun rolü	10
Şekil 2.2. Çoklu paralel vuruş teorisi	11
Şekil 2.3. NAYKH patogeneğinde makro ve mikro besin öğelerinin katkısı.....	19
Şekil 2.4. NAYKH ve ileri fibrozisli hastaları non-invaziv olarak değerlendirmek için algoritma	28
Şekil 2.5. Bağırsakta oluşan disbiyozise karşı karaciğerde oluşan immün cevap.	37
Şekil 2.6. Kişiselleştirilmiş diyet modeli	45
Şekil 2.7. Sirkadiyen saatin fizyoloji üzerindeki etkisi.....	57
Şekil 2.8. Sirkadiyen sistemin çalışması.....	60
Şekil 2.9. Karaciğer fizyolojisinin sirkadiyen düzenlemesi.....	68
Şekil 2.10. Besin alımının sirkadiyen zamanlaması	75
Şekil 3.1. Deney protokolü	79
Şekil 4.1. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre yem tüketim miktarları (g/gün)	104
Şekil 4.2. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre su tüketim miktarları (mL/gün)	105
Şekil 4.3. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre günlük ortalama enerji alımları (kkal/gün).....	107
Şekil 4.4. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre deneyin başlangıcı, 7.hafta ve 13.hafta vücut ağırlıkları (g)	108
Şekil 4.5. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre vücut ağırlığı değişimi (%).	109
Şekil 4.6. Kontrol grubu (a), YFD grubu (b) ve YFD+probiyotik grubu (c) sıçan karaciğerlerinin histolojik görünimleri (HEx200)	112
Şekil 4.7. Genlerin gruplar arası Katsayı Değişim (Fold Change, FC) grafiği	117

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Sıçanların gruplara ayrılması ve barınma koşulları	80
Resim 3.2. Sıçanlara gavaj yoluyla probiyotik uygulanması.....	81
Resim 3.3. Fruktoz miktarının hassas terazi ile ayarlanması.....	81
Resim 3.4. Sıçanların boy uzunluğu, vücut ağırlığı ve bel çevresi ölçümleri	82
Resim 3.5. Sıçanların batin bölgesinin açılması	83
Resim 3.6. Karaciğer dokusunun çıkartılması ve formaldehit solüsyonuna konulması	83
Resim 3.7. Total RNA ekstraksiyonu	88
Resim 3.8. Ters transkriptaz işlemi.....	89
Resim 3.9. Threshold çizgisi ile eşik değerinin belirlenmesi	90
Resim 3.10. Hemotoksilen-Eozin boyama cihazı.....	98
Resim 3.11. Mikroskop cihazı	99

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
kkal	Kilokalori
M	Medyan
mg	Miligram
mL	Mililitre
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
ng	Nanogram
p	Anlamlılık düzeyi
pg	Pikogram
Q1	İnterquantilerange 1 (25.yüzdelik)
Q3	İnterquantilemelarange 3 (75.yüzdelik)
r	Korelasyon katsayısı
SS	Standart sapma
$\bar{x}$	Ortalama

Kısaltmalar

Açıklamalar

$2^{\Delta\Delta Ct}$	Ekspresyon seviyesi belirlenmek istenilen genin gruplar arasındaki katsayı (FC) değeri
-----------------------	--

Kısaltmalar**Açıklamalar**

AASLD	Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği (American Association for the Study of Liver Diseases)
AHRQ	Sağlık Hizmetleri Araştırma ve Kalite Ajansı (Agency for Health Research and Quality)
AISF	Karaciğer Çalışmaları İtalyan Derneği (The Italian Association for the Study of the Liver)
ACTB	Beta Aktin
ALD	Alkolik Karaciğer Hastalığı
ALP	Alkalin Fosfataz
ALT	Alanin Aminotransferaz
AMP	Antimikrobiyal Peptit
AMPK	AMP ile Aktive olan Protein Kinaz (AMP-Activated Protein Kinase)
APRI	AST/Trombosit Oranı
Asetil-CoA	Asetil Koenzim A
ASH	Alkolik Steatohepatit
AST	Aspartat Aminotransferaz
BKİ	Beden Kütle İndeksi
BMAL1	Memelilerde beyin ve fare argonot benzer 1 (Brain and Muscle Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocatorprotein 1)
cDNA	Tamamlayıcı DNA (Complementer DNA, cDNA)
CFU	Koloni Oluşturan Birimler (Colony Forming Units)
CLOCK	Sirkadiyen Lokomotor Döngü Ürünleri Bozukluğu (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput)
Cry	Kriptokrom (Cryptochrome)
Ct (Cp-Cq)	Eşik Değeri (Treshold Cycle)
DAMPs	Hasarla İlişkili Moleküler Kalıplar (Damage-Associated Molecular Patterns)
DASH	Hipertansiyonu Durdurmak İçin Diyet Yaklaşımı (Dietary Approach to Stop Hypertension)

Kısaltmalar**Açıklamalar**

dCT (ΔCt)	Ekspresyon seviyesini belirlemek istediğimiz genin Ct değeri ile normalizatör genin Ct değerinin farkı
ddCt (ΔCt)	Ekspresyon seviyesi belirlenmek istenilen genin gruplar arasındaki farkı
DZAA	Dallı Zincirli Aminoasit
EASL	Avrupa Karaciğer Araştırma Derneği (European Association for the Study of the Liver)
EGCG	Epigallocateşin Gallat
ELF	Gelişmiş Karaciğer Fibrozisi (Enhanced Liver Fibrosis)
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Deneyi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FC	Katsayı Değişimi (Fold Change)
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)
FIAF	Açlığa Bağlı Yağ Faktörü (Fasting-Induced Adipose Factor)
FMT	Fekal Mikrobiyota Transplantasyonu
FOS	Fruktooligosakkarit
FXR	Farnesod X Reseptörü
GGT	Gama Glutamil Transferaz
GLP-1	Glukagon-Benzeri Peptit-1
GLUT2	Glukoz Taşıyıcı Tip 2 (Glucose Transporter Type-2)
GLUT4	Glukoz Taşıyıcı Tip 4 (Glucose Transporter Type-4)
GLUT5	Glukoz Taşıyıcı Tip 5 (Glucose Transporter Type-5)
GOS	Galaktooligosakkarit
GPR	G-protein bağlı reseptör (G-protein-coupled receptor)
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HBV	Hepatit B Virüsü

Kısaltmalar**Açıklamalar**

HCC	Hepatoselüler Karsinoma
HCV	Hepatit C Virüsü
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HE	Hepatik Ensefalopati
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
HRP	Avidin-Horseradish Peroksidaz
I148M	İzolösin-Metionin Protein Varyantı (148 Isoleucine to Methionine Protein Variant)
IL-1β	İnterlökin-1 β (İnterleukin-1 β)
IL-6	İnterlökin-6 (İnterleukin-6)
ISAPP	Uluslararası Probiyotik ve Prebiyotik Bilimsel Derneği (International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics)
JNK	c-Jun N-Terminal Kinaz
KASL	Kore Karaciğer Araştırmaları Derneği (Korean Association for the Study of the Liver)
KVH	Kardiyovasküler Hastalık
KZYA	Kısa Zincirli Yağ Asidi
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
LPS	Lipopolisakkarit
MAMPs	Mikrobiyal İlişkili Moleküler Modeller (Microbial-Associated Molecular Patterns)
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MBOAT7	Membran Bağlı O-asiltransferaz Alanı İçeren 7 (Membran Bound O-acyltransferase Domain- Containing 7)
MDA	Malondialdehit
MUFA	Tekli Doymamış Yağ Asidi
NAS	Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı Aktivite Skoru

Kısaltmalar**Açıklamalar**

NASH	Alkolik Olmayan Steatohepatit
NAYKH	Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B (Nükleer Faktör Kappa B)
NLR	Nod-Benzeri Reseptör
OD	Optik Yoğunluk
PAI-1	Plasminojen Aktivatör İnhibitör-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)
PAMPs	Patojenle İlişkili Moleküler Kalıplar (Pathogen-Associated Molecular Patterns)
PCA	Perklorik Asit
Per	Period
PNPLA3	Patatin Benzeri Fosfolipaz Domain-İçeren 3
PPAR	Peroksizom Proliferatör ile Aktive olan Reseptör
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (Real-Time Quantitative PCR)
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
Rev-erbα	Ters Eritroblastoz Virüs Alfa (Reverse Erythroblastosis Virus Alpha)
Ror-α	Retinoik Asitle İlgili Orphan Reseptör Alfa (Retinoic Acid-Related Orphan Receptor Alpha)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SBP	Spontan Bakteriyel Peritonit (Spontaneous Bacterial Peritonitis)
SFA	Doymuş Yağ Asidi
SCN	Suprakiazmatik Nükleus
Sirt1	Sirtuin 1
SOD	Süperoksit Dismutaz
SREBP-1c	Sterol Düzenleyici Eleman Bağlayıcı Protein-1c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c)
TGR5	G Protein Birleştirilmiş Membran Reseptörü-5 (G Protein-Coupled Membrane Receptor 5)
TLR	Toll Benzeri Reseptör (Tool-Like Reseptör)

Kısaltmalar**Açıklamalar****T_m**

Erime Sıcaklığı (Melting Time)

TNF- α Tümör Nekrozis- α **VLDL**

Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

 ω -3

Omega-3

 ω -6

Omega-6

YFD

Yüksek Fruktozlu Diyet



1. GİRİŞ

Bağırsak-karaciğer eksenini çevresel, genetik ve diyet faktörlerinin oluşturduğu sinyaller sonucu ortaya çıkan, mikrobiyota da dahil olmak üzere bağırsak ve karaciğer arasındaki karşılıklı etkileşimi ifade etmektedir [1]. İmmün cevap, intestinal bariyer fonksiyonu ve mikrobiyota disbiyozu arasında bir ilişki bulunmaktadır [2]. Bağırsak karaciğer etkileşiminde safranin rolü, bağırsak bariyer homeostazı ve bağırsak mikrobiyom işlevi ve bileşimi hakkında daha fazla bilgi sahibi olundukça birçok karaciğer hastalığının temelini bu eksene dayandığı da kabul görmeye başlamıştır [1].

Bağırsak mikrobiyota disbiyozu; alkolik olmayan steatohepatit (NASH), hepatik ensefalopati (HE), siroz, alkolik karaciğer hastalığı (ALD) ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAYKH) gibi karaciğer bozukluklarıyla ilişkilendirilmiştir [3]. Mikrobiyomda ve mukozal bağışıklık yanıtında oluşan bir değişiklikte karaciğer etkilenmektedir. Mukozal bağışıklık bakteri algılanmasının değiştiği ve enterik bariyer işlevinin bozulduğu steatohepatitte ve otoimmün karaciğer hastalıklarında da yine bağırsak rol oynamaktadır [4]. Karaciğer ise hem portal ven yoluyla alınan besin maddeleri ve bakteriyel son ürünlere yanıt yolu ile hem de enterohepatik dolaşım ve safra asidi üretimindeki işlevlerinden dolayı bağırsak mikrobiyotasının modülasyonunda önemlidir [5]. Bağırsağı modüle ederek karaciğer hastalıklarına neden olan belirteçleri etkileme ve düzeltme özelliğinden dolayı prebiyotik, probiyotik, sinbiyotik ve fekal mikrobiyota transplantasyonu (FMT) gibi yöntemler gelecekteki potansiyel tedaviler olarak görülmektedir [6].

Karaciğer hastalıkları her yıl 1 milyondan fazla kişinin ölümüne neden olan küresel bir sağlık sorunudur [7]. Karaciğer hastalıklarından olan NAYKH, en yaygın karaciğer hastalığı olup Amerika'da 65 milyondan fazla kişiyi etkilemekte ve 103 milyar dolar mali yüke neden olmaktadır. Karaciğer hastalıklarının sosyal ve ekonomik yükünü azaltmak için moleküler olayların aydınlatılması ve yeni terapötik yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir [8].

Alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalığı (NAYKH); yüksek kalorili bir diyet ile desteklenen, önceden belirlenmiş polimorfizmler ile karakterize genetik bir profil varlığında, hepatik metabolik sendrom sınırı olarak kabul edilmektedir [9]. Yüksek

miktarda alkol tüketimi (<20 g etanol / gün) veya diğer bilinen steatoz nedenleri (örneğin, ilaçların veya toksinlerin gereksiz kullanımı) olmadan ortaya çıkan yaygın bir karaciğer hastalığıdır [10]. Fruktöz tüketiminin NAYKH oluşumuna neden olan etmenlerden biri olduğu bildirilmiştir. Fruktöz tüketimi ile NAKYH oluşumuna katkı sağlayacak faktörler ise metabolik sendromun uyarılması, bakır eksikliği, yağ depolarının değişmesi, bağırsaktan karaciğere bakteriyel translokasyon, ileri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşumu ve karaciğerde enzimatik yolların regüle olamamasıdır [11].

Sirkadiyen ritim; günün 24 saatlik döngüsünü takip eden, uyku/uyanıklık döngüsü, beslenme/açlık döngüsü, endokrin ve metabolik ritimler dahil olmak üzere birçok önemli fizyolojik aktivitenin tam olarak düzenlenmesini sağlayan biyolojik sistemdir [12]. Sirkadiyen saatin düzenlenmesi iki şekilde gerçekleşmektedir: 1-) Hipotalamusun Suprakiazmatik Nükleus (SCN) içindeki ana saatten salınan nöral ve humoral sinyaller ile düzenlenmesi, 2-) Besin gibi diğer işaretlerle SCN'den bağımsız düzenlenmesidir [13]. Sirkadiyen ritmin senkronizasyonunun bozulması kronik jetlag, vardiyalı çalışma, bilerek uykunun kısıtlanması, besin alımı yoksunluğu ve gece yeme gibi çevresel etkilerle gerçekleşmektedir [12]. Sirkadiyen saat aynı zamanda transkripsiyonel-translasyonel feedback döngülerinden oluşan moleküler osilatörlerdir. Pozitif tarafında sirkadiyen lokomotor döngü ürünleri bozukluğu (Circadian locomotor output cycles kaput, CLOCK; ontoloğu NPAS2) ve memelilerde beyin ve fare argonot benzer 1 (brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocatorprotein 1, BMAL1; diğer adı ARNTL) genleri bulunur ve diğer saat genlerinin (Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Rev-Erb α) promotorlarında E-box elemanlarını bağlar. Negatif tarafında ise kriptokrom (CRY) ve periyot (PER) proteinleri bulunur ve birbirleriyle heterodimerize olurlar ayrıca CLOCK: BMAL1 kompleksini inhibe ederler [13].

Alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalığı için yeni terapötik yaklaşım hipotezleri; fekal mikrobiyota transplantasyonu, antibiyotik, safra asitleri modülasyonu, bariatrik cerrahi, farmabiyotik, hedeflenen peptitler, probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotik kullanımıdır [14]. Bu tedavileri sağlarken bir taraftan da bağırsak mikrobiyotasına yapılan bazı müdahalelerin karaciğer ile ilgili hastalıklarda iyileştirici özellikleri üzerine farklı metabolik yollar üzerinde durulmaktadır [15, 16]. Diğer taraftan ise sirkadiyen saat genlerinin yeniden programlanmasını sağlayarak metabolik disfonksiyonları azaltmayı hedefleyen fonksiyonel besin bileşenleri ile ilgili çalışmalar (resveratrol, epigallokateşin

gallat /EGCG, L-karnitin vs. kullanımı ile metabolik disfonksiyonun iyileştirilmesi, lipid homeostazının sağlanması gibi) yapılmaktadır [17-20]. Bu bilgiler ışığında literatürde probiyotik kullanımı ile mikrobiyotanın düzenlenmesi sağlanarak karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesinde, metabolik yolak olarak sirkadiyen saatin yeniden programlanması yolunun kullanılıp kullanılmadığının sorgulandığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışma sıçanlarda alkolik olmayan karaciğer yağlanması modeli oluşturarak, bağırsak mikrobiyotası – karaciğer eksenini kullanarak, bağırsağa yapılan *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) müdahalesi ile hepatositlerdeki sirkadiyen saati yeniden programlayarak metabolik bozukluğu iyileştirmek amacıyla planlanıp yürütülmüştür. Bu amaç doğrultusunda hedeflenen, NAYKH modeli oluşturmak, probiyotik tedavisi uygulayarak bağırsak mikrobiyotasını ve dolayısı ile bağırsak fonksiyonlarını düzenlemek, bağırsağın iyileştirilmesi sonucu karaciğer hasarını iyileştirmek ve tüm bunları uygularken sirkadiyen saatin yeniden programlandığını göstermektir.

Çalışmanın hipotezleri;

1. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı bulunan sıçan modellerinde mikrobiyotanın düzenlenmesi sirkadiyen saati değiştirir.
2. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı bulunan sıçan modellerinde mikrobiyotanın düzenlenmesi karaciğer fonksiyonlarını iyileştirir.
3. *Lactobacillus rhamnosus* GG tedavisi mikrobiyotayı ve bağırsak fonksiyonlarını düzenler.
4. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı bulunan sıçanlarda mikrobiyotanın düzenlenmesi, sirkadiyen saatin düzenlenmesi yoluyla karaciğer fonksiyonlarını iyileştirir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Hastalıkları

Karaciğer hastalıkları dünya çapında önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Kronik karaciğer hastalıklarının en yaygın etiyolojileri arasında kronik hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu, kronik hepatit B virüs (HBV) enfeksiyonu, alkolü kötüye kullanma ve NAYKH bulunmaktadır. Kronik karaciğer hasarı karaciğer fibrozuna yol açabilmektedir. Fibrozun son aşamasında ise karaciğer yetmezliği, portal hipertansiyon ve siroz görülebilmektedir [21].

2.1.1. Alkolik olmayan karaciğer yağlanması

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, ilaç veya alkol gibi ikincil bir neden yokluğunda hepatositlerde $\geq 5\%$ makrovesiküler steatoz olarak tanımlanmaktadır [22].

2.1.2. Alkolik olmayan steatohepatit

Alkolik olmayan steatohepatit, NAYKH'nın inflamatuvar ve sıklıkla ilerleyici olan bir alt tipidir. Hastalık ilerledikçe siroz gelişebilmekte ve karaciğer nakline ihtiyaç duyulabilmektedir [23]. Genel popülasyondaki sıklığının $1,5\% - 6,45\%$ olduğu tahmin edilmektedir [24].

NASH oluşumunu sağlayan olaylar arasında, bağırsak vasküler bariyeri ve bağırsak epitelyal bariyerde oluşan bozulmalar mevcuttur [25]. Mouzaki ve diğerleri (2013) topladıkları dışkı örneklerinde total bakteri içeriğini ölçmüşlerdir. Diyet ve beden kütle indeksinden (BKİ) bağımsız olarak düşük Bacteroidetes yüzdesi ile NASH varlığı arasında önemli bir ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır [26]. Bağırsak disbiyozu sonucu hepatik steatohepatit oluşumunu sağlayan patofizyolojik olaylar;

- 1- Tool-benzeri reseptör (Tool-like reseptör, TLR) aracılı sitokin üretimi olması ve metabolik endotoksemi nedeniyle hepatik inflamasyonda artış,
- 2- Hepatik steatoz (*de novo* lipogenez),
- 3- İnsülin direncinde artış,

- 4- Endojen ethanol tarafından iltihaplanma, oksidatif stres indüksiyonu ve bağırsak bariyer geçirgenliğinde değişiklik (sızdıran bağırsak),
- 5- Farnesoid X reseptörü (FXR) sinyallemede ve safra asidi metabolizmasında değişiklik,
- 6- Bağırsakta disbiyoz sonucu kolin metabolizmasının değişmesi ile çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) salgısı ve birleşiminde azalma olmasıdır [27].

2.1.3. Alkolik steatohepatit

Alkolik steatohepatitin (ASH) ilerlemesi ve gelişmesinin temel sebebi inflamatuvar süreçlerdir. Bağırsak bariyer bütünlüğündeki kayıp, mikrobiyal disbiyozis (dengesiz veya anormal bağırsak mikrobiyal bileşimi), hepatoselüler stres / ölüm ve organlar arası iletişimin bozulmasına yanıt olarak inflamatuvar süreçler gelişmektedir [28]. Bu hastalarda apoptotik hepatositler ve hepatosit balonlaşması görülmektedir [29]. Şiddetli ASH'da nötrofillerin infiltrasyonu da görülmektedir [28].

2.1.4. Alkolik karaciğer hastalığı

Alkolik karaciğer hastalığı Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da görülen en yaygın karaciğer hastalıklarından birisidir [30]. Alkol tüketimi dünyadaki tüm ölümlerin %3,8'ini oluşturmaktadır [31]. Karaciğer hastalıklarında, aşırı alkol tüketiminden kaynaklanan ölüm oranlarının Finlandiya'da %87 ve Avrupa Birliği'nde %60 - %80 olduğu bildirilmektedir [32]. Hastalığa neden olan ağır kronik alkol tüketim miktarı her gün >40 g saf alkol (>1 litre hacimce %5 biraya veya 375 mL hacimce %13 şaraba eşittir) olması durumunda gerçekleşmektedir [30].

Akut alkol hasarının sonuçlarından biri olup karaciğer hasarının ilerlemesini sağlayan faktörlerden birisi oksidatif strese bağlı hepatosit apoptozisidir. Bağışıklık hücresi aktivasyon döngüsü de karaciğer hasarının ilerlemesini sağlar. Aşırı hepatosit apoptozisi uyarır ve bu da reaktif oksijen türlerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyarır [29].

2.1.5. Hepatik ensefalopati ve spontan bakteriyel peritonit

Hepatik ensefalopati, kronik veya şiddetli akut karaciğer yetmezliğinin bir komplikasyonu olup bilişsel, kişilik ve motor fonksiyonu ve bilinç değişiklikleri ile karakterizedir. Sindirim sistemi kanaması, enfeksiyon, elektrolit bozukluğu, dehidrasyon, kabızlık, aşırı dozda diüretik kullanımı gibi bağırsak da etkileyen durumlar HE epizodlarının öncül faktörleridir [33].

Spontan bakteriyel peritonit (SBP), sirozlu hastalarda en sık görülen bakteriyel enfeksiyon türü olup, sirozlu hastalarda HE, yüksek mortalite (%10 - %50) ve akut böbrek hasarına neden olan ciddi bir komplikasyondur. Bağırsak hareketliliğinin azalması bağırsakta aşırı bakteri büyümesine yol açması, yerel bağışıklık yanıt sisteminde eksiklik olması, bakteriyel translokasyon ve bağırsak mukozal savunma bariyerinin işlevi ve yapısında değişiklik olması SBP'ye yol açan mekanizmalar arasındadır [34, 35].

2.1.6. Hepatoselüler karsinoma

Hepatoselüler karsinoma (HCC), primer karaciğer kanserlerinin çoğundan sorumludur. HCC oluşumu temelde HCV ve HBV enfeksiyonlarından ve bazen NAYKH ve / veya alkolü kötüye kullanmadan kaynaklanmaktadır. Etiyolojide alkolik olma (riske başlamanın düşük dozu: 10g/1 birim/gün) durumunun HCC vakalarına katkısı 2015 yılında yaklaşık %30 olarak bulunmuştur [36].

Bağırsakta patojen bakteriler aşırı büyür ve karaciğer DNA'sı ile karsinojenler bağlanır. Daha sonra bağırsak bariyer fonksiyonu bozulur. Endotoksemi gözlenir (lipopolisakkaritler, LPS) artar, TLR-4 sinyal aktivasyonu olur vs.) ve bakteriyel translokasyon gerçekleşir. Proinflamatuvar sitokinler salınır ve Kupffer hücreleri aktive olur [37].

2.1.7. Hepatit B virüs enfeksiyonu

Hepatit B virüsü, immün anergi (belirli bir alerjen veya antijene karşı normal bağışıklık tepkisinin olmaması) yoluyla insanlarda kronik bir enfeksiyon oluşturabilen, büyük ölçüde hepatositlerde enfekte olup çoğalan, *Hepadnaviridae* familyasına ait, hepatotropik bir DNA virüsüdür [38]. Tüm dünyada yaklaşık 350-400 milyon kişiyi enfekte ettiği

düşünülmektedir. Her yıl yaklaşık 1 milyon kişi ise HBV ile ilişkili hastalıklardan hayatını kaybetmektedir [39]. HBV, karaciğer hücrelerinde kendini çoğaltır ve antijen salınımı ile eş zamanlı olarak T helper 1, T helper 2, T helper 17 ve T cell'i (enfeksiyona karşı uygun immün cevabı geliştirir) içeren antogonistik bağışıklık tepkisini indükler [40].

2.1.8. Hepatit C virüs enfeksiyonu

Hepatit C, *Flaviviridae* familyasına ait hepatotropik bir RNA virüsü olan HCV'nin neden olduğu, önce akut sonra kronik HCV gelişimine neden olabilen, karaciğer hasarı ile sonuçlanan bulaşıcı bir hastalıktır [41]. Dünya çapında 170 milyondan fazla insanı enfekte ettiği ve her yıl 3-4 milyon insanın enfekte olduğu tahmin edilmektedir [42, 43]. Kronik HCV enfeksiyonu, kronik inflamatuvar bir süreci tetikleyip siroz, ölüm, karaciğer fibrozu ve hepatoselüler karsinomaya yol açabilmektedir [41]. Bunun sonucunda da HCV nedenli karaciğer ile ilişkili ölüm oranı yılda ortalama 350.000 kişi olmaktadır [42].

2.1.9. Karaciğer sirozu

Karaciğer sirozu, immün disfonksiyon ve makrofajlarda antimikrobiyal eliminasyon ve tanıma mekanizmalarının bozulması sonucu gelişen son dönem organik bir hastalıktır [44]. Dünya çapında en sık mortalite ve morbidite nedenlerindendir ve yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde bile 2 yılda %26,4 ölüm oranına sahiptir [45].

TLR toleransı kaybı ve/veya immün hücre yanıtının kontrolsüz aktivasyonu ile bakteriyel translokasyon tetiklenir. TLR-2 ve TLR-4 bağımlı yollar aktive olunca endotoksin veya LPS ile sistemik inflamatuvar aktivite artar ve sitokin üretimi kolaylaşır. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) salgısı artar ve bağırsakta geçirgenliğin artması sonucu "geçirgen bağırsak sendromu" gerçekleşir [44]. Sirozlu hastalarda en sık görülen enfeksiyonlar idrar yolu enfeksiyonu, yumuşak doku enfeksiyonları, pnömoni, SBP ve spontan bakteremidir [46].

2.2. Alkolik Olmayan Karaciğer Yağlanması

2.2.1. Epidemiyolojisi

NAYKH'nın genel popülasyondaki oranının %25,2 olduğu tahmin edilmektedir [47]. Afrika'da yaklaşık %13, Avrupa'da %23 ve Orta Doğu'da ise %32'ye kadar çıkmaktadır

[22]. İran'da %4,1, İsrail'de %30 ve Suudi Arabistan'da %16,6 oranında olduğu gözlenmiştir. Çin'de NAYKH'nın prevalansı ise son 20 yılda ikiye katlanmış olup metabolik sendrom ve obezitenin yaygın olduğu şehirlerde %27 ve genel olarak yetişkinlerde %15 oranında olduğu bulunmuştur. Japonya'da erkekler (%41) ve kadınlar (%17,7) arasında 3 kat fark olup genel prevalansının %29,7 olduğu bulunmuştur [48].

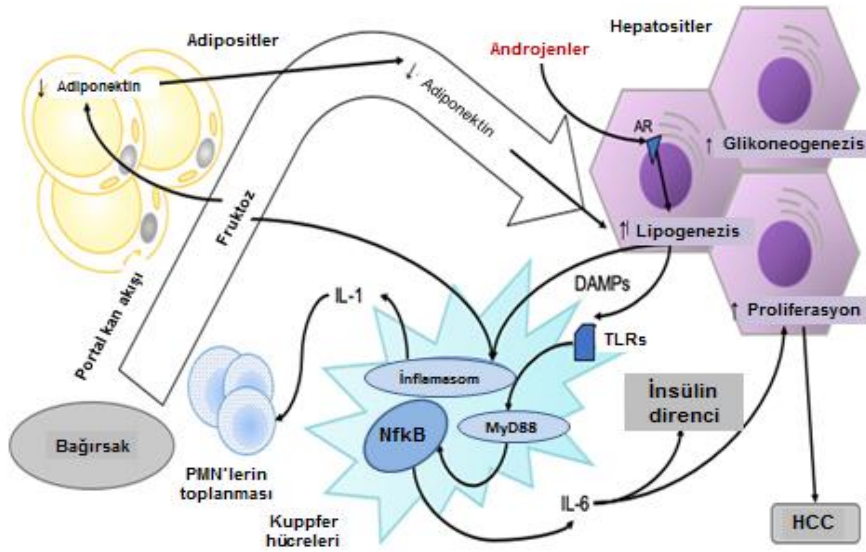
Türkiye'de NAYKH'nın genel prevalansının %48,3 olduğu, en yüksek yaygınlık oranlarının erkeklerde (%64), 50 yaşın üzerindeki kişilerde (%65,6) ve BKİ >25 kg/m² olan bireylerde (%63,5) olduğu bildirilmiştir [48].

2.2.2. Etiyolojisi

Metabolik sendrom, NAYKH'nın temelini oluşturmaktadır. Metabolik sendrom; abdominal obezite, azalmış yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol, hiperglisemi, artmış trigliseritler ve artmış kan basıncının en az üçünün varlığı ile tanımlanmaktadır. İnsülin direnci ise neredeyse tüm metabolik sendrom durumlarını ve dolayısıyla diyabet ve NAYKH'nı açıklamaktadır [49]. Dislipidemi varlığı da NAYKH için bir risk faktörüdür [50].

Obezite NAYKH'nın güçlü bir risk faktörüdür. Obez hastaların %80'inde, vücut ağırlığı normal olan ve metabolik risk faktörleri olmayan bireylerin ise %16'sında NAYKH prevalansı olduğu bildirilmiştir [51].

Cinsiyet açısından bakıldığında kadınlarda obezite prevalansı yüksek olmasına rağmen, erkeklerde ve menapoz sonrası kadınlarda NAYKH riski daha yüksektir. Kadınlarda östrojenin koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir [50, 52]. Postmenapozal kadınlarda gözlenen hormonal değişiklikler, abdominal yağ kütlesindeki artış ve yaşlanma ile etkileşim sonucu NAYKH riski artmaktadır [53]. Cinsel dismorfizm metabolik ve inflamatuvar basamakları modüle etmektedir. Erkeklerde hem bağırsak hem de yağ dokusu NAYKH ilerlemesine ve gelişimine katkıda bulunur. TLR'ler ve inflamasyon (NLRP3) aktive edilir ve Kupffer hücreleri interlekin-1 (IL-1) ve interlekin-6 (IL-6)'yı serbest bırakır ve hepatositlerin metabolizması değişir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Erkeklerde alkolik olmayan karaciğer yağlanması patofizyolojisinde bağırsak ve fonksiyonel olmayan yağ dokusunun rolü [54]

PMN, nötrofil; DAMPS, damage-associated molecular patterns; TLRs, Tool-like receptors; HCC, hepatoselüler karsinoma; NfκB, nükleer faktör kappa B; MyD88, myeloid differentiation primary response 88.

Artmış ferritin seviyeleri ve patatin benzeri fosfolipaz domain-içeren 3 (PNPLA3) izolösün-metionin protein varyantı (148 Isoleucine to Methionine protein variant, I148M) polimorfizmi NAYKH'da hepatik fibrozis ve hepatik yağ gelişimi için risk faktörleri arasındadır [55].

Kesitsel çalışmalara bakıldığında NASH hastalarında yaşın artmasının daha şiddetli fibroz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bu durum popülasyonlardaki metabolik maruziyetlerin kümülatif toplamını ve daha uzun süre NAYKH / NASH süresini de yansıtabilmektedir [56, 57]. Başka bir çalışmaya bakıldığında ise yaşın fibroz ilerleme oranını tutarlı bir şekilde etkilemediği gösterilmiştir [58].

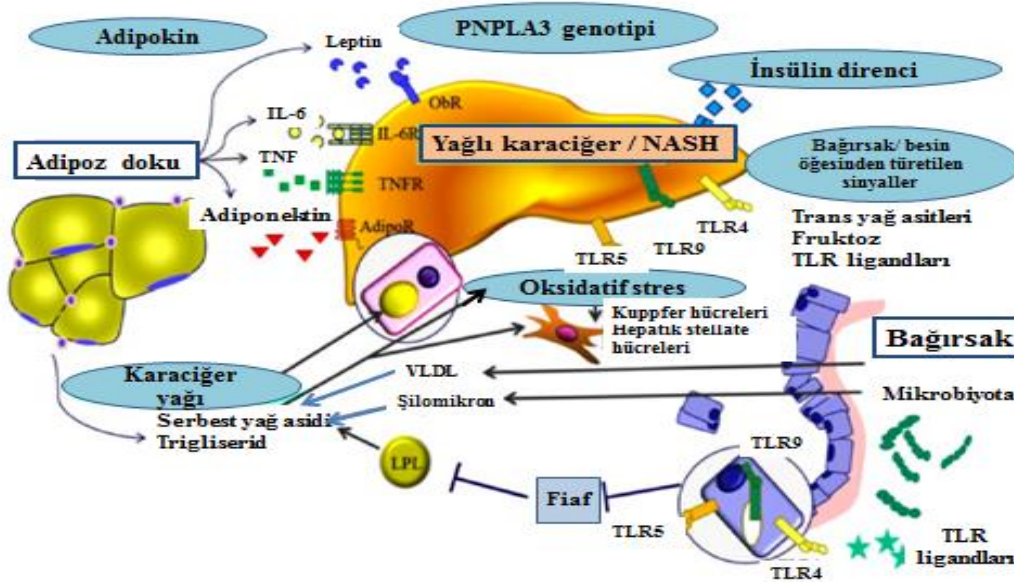
2.2.3. Patogenezi

Alkolik olmayan karaciğer yağlanması yaşam tarzı, diyet ve inflamasyondan etkilenmektedir. Diyet (serbest yağ asitleri, kolesterol vs.), egzersiz ve inflamasyon ile ilişkili olarak dolaşımdaki lipitler, kas (irisin), yağ (adiponektin, leptin vs.) ve karaciğer dokuları tarafından salınan araçlar (selanoprotein P, fetuin-A, vs.) ve bağırsak (glukagon-

benzeri peptit-1/GLP-1, ghrelin vs.) ve pankreas (insülin, glukagon vs.) hormonları gibi dolaşımdaki mediatörler arasındaki patofizyolojik etkileşim NAYKH'nın temelini oluşturmaktadır [59].

Çoklu vuruş hipotezi

“İki vuruş” hipotezine göre sedanter yaşam tarzı, insülin direnci, yüksek yağlı beslenme ve obeziteye bağlı olarak karaciğerde lipit birikimi ilk vuruş olarak hareket eder ve karaciğeri ikinci vuruş için duyarlı hale getirir. İkinci vuruş ise fibrojenez ve inflamatuvar kaskadları aktive eder [60]. Genetik olarak yatkın bireylerde çoklu paralel faktörler hastalığın gelişimi ve ilerlemesini açıklamakta yetersiz kaldığı için “çoklu vuruş” hipotezi ortaya çıkmıştır. Bu çoklu vuruşlar arasında yağ dokusundan salgılanan hormonlar, bağırsak mikrobiyotası, insülin direnci, beslenme faktörleri, epigenetik ve genetik faktörler bulunmaktadır [61]. Diyabet ve obezite, insülin direncini, bağırsak florasında değişiklikleri ve adiposit proliferasyonunu indükler. Adipositler tarafından üretilen tümör nekrozis- α (TNF- α) ve IL-6 gibi adipokinler karaciğer inflamatuvar ortamını ve hepatosit yağ içeriğini etkilemektedir (Şekil 2) [62].



Şekil 2.2. Çoklu paralel vuruş teorisi [62]

NASH, alkolik olmayan steatohepatit; Fiaf, açlığa bağlı yağ faktörü; TLR, tool-like reseptör; PNPLA3, patatin-like phospholipase domain-containing 3; LPL, lipoprotein lipaz; IL-6, interlökin-6; AdipoR, adiponektin reseptör; ObR, leptin reseptör; VLDL, çok düşük dansiteli lipoprotein.

İnsülin direnci

Sağlıklı bireylerde insülin, periferik yağ dokusundan serbest yağ asidi üretimini ve *de novo* hepatik VLDL üretimini baskılar [63]. İnsülin ile hepatik asetil koenzim A (asetil-CoA) konsantrasyonlarının mevcudiyeti ve piruvat karboksilazın aktivitesi azalmaktadır, bu da piruvatın glikoza dönüşümünün azalmasına neden olmaktadır [64].

İnsülin direnci, hormonun hedef hücredeki (örneğin; adiposit, hepatosit ve kas hücresi) veya tüm organizma düzeyindeki etkisine karşı kusurlu bir metabolik yanıtı ifade eder. Hepatik insülin direnci, lipogenezin korunmuş stimülasyonu varlığında hepatik glukoz üretiminin bozulmuş insülin aracılı baskılanmasından oluşur. Sistemik insülin direnci, kas hücresinin yüzey membranında glukoz taşıyıcı tip 4 (GLUT4) reseptörünün bozulmuş translokasyonu nedeniyle insülinin serum glukoz konsantrasyonunu uygun seviyeye düşürme yeteneğinin engellenmesidir. Sonuç olarak insüline bağlı olan glikoz alımı azalır [65]. Yağ sisteminde insülin direnci ise insülinin lipolizi baskılayamaması anlamına gelir. İnsanda, lipid biriktirme kapasitesi aşıldığında hepatik insülin direnci ilerlemesi muhtemeldir [66].

Obez bireylerde artan viseral yağ dokusu, insülin direncine ve ardından dolaşımdaki serbest yağ asitleri, hepatik VLDL üretimi ve glukoneogenezi artıran hiperinsülinemiye yol açmaktadır. Viseral yağlanma ayrıca karaciğere akan portal kan serbest yağ asitlerini de arttırır. Bu mekanizmaların kombinasyonu aşırı hepatik steatoz ile sonuçlanmaktadır [63].

Yağ dokusu

NAYKH olan hastaların karaciğerinde yağ, esas olarak gliserol ve serbest yağ asitlerinin esterleşmesinden türetilen trigliseritler şeklinde birikir [67]. Serbest yağ asitlerinin fazlalığının (asetil-CoA sentaz aktivitesine giren ve esterifikasyon veya β -oksidasyon yollarını tetikleyebilen yağlı asetil-CoA'ları oluşturan) aksine trigliserit birikimine bakıldığında hepatotoksik olmadığı görülmektedir [68].

Adipoz dokunun, endokrin işlevinin olduğu ve adipokinler olarak belirtilen adiponektin ve leptin gibi hormonları salgıladığı bilinmektedir [69]. Adipoz doku tarafından üretilen leptin, adiponektin ve rezistin gibi birçok molekül ve interlökinler ve TNF- α gibi

proinflamatuar sitokinler NAYKH patogeneğinde rol oynayabilmektedir [70]. Adipoz doku, proinflamatuar sitokinleri üreterek düşük dereceli inflammatuar durumların korunmasına yardımcı olur: TNF- α 'nın adiposit ekspresyonu ve IL-6'nın serum seviyeleri obez hastalarda artar ve vücut ağırlığı kaybını takiben ise azalır [71, 72].

Adiponektin

Adipoz dokudan salgılanan adiponektin molekülünün düşük seviyesi NAYKH ile ilişkilidir [73]. Adiponektin, periferik ve hepatik insülin direncini iyileştirir ve hepato-koruyucu ve anti-inflamatuar aktivitelere sahiptir [74]. Adiponektin, AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) aktive ederek ve asetil-CoA karboksilazı inaktive ederek ve PPAR- α geninin ekspresyonunu arttırarak karaciğer yağ oksidasyonunu arttırdığı için inflammatuar yanıtın bir modülatörü olarak görev yapar [75, 76]. Ayrıca *de novo* lipogenezi önleyerek insülin duyarlılığını iyileştirdiği ve kardiyovasküler hastalık riskini azalttığı bildirilmiştir [73]. Anti-inflamatuar etkisi ise; anti-inflamatuar sitokinlerin salgılanması, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) aktivasyonunun bloke edilmesi ve IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin salınımının inhibe edilmesi ile meydana gelir [77].

Leptin

Leptin, adipoz olmayan bölgelerde lipid birikimini önleyen proinflamatuar etkilere sahip anoreksijenik bir hormondur [78]. Kupffer hücrelerinin leptin tarafından hedeflendiği ve dönüştürücü büyüme faktörü (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) üretmek için uyarıldığı ve ardından hepatik stellate hücrelerini aktive ettiği öne sürülmüştür [79]. Obez hastalarda adiponektinin azalması ve leptinin artması fibrojeniz ve inflamasyon aktivasyonu ve hepatik steatoza neden olabilir [80].

Rezistin

Rezistin, memelilerde glikoz metabolizmasını düzenleyen az miktarda salgılanan bir proteindir. Yüksek rezistin seviyeleri proinflamatuar etki gösterir ve insülin direncini indükler [81]. Dolayısıyla hepatik insülin direncinin patogeneğinde de rol oynamaktadır. Rezistin, NAYKH olan hastaların karaciğerindeki patolojik değişiklikleri

şiddetlendirmektedir [82]. NAYKH'nda serum rezistin düzeyleri ile fibrozis evresi ilişkili bulunmuştur [83].

Visfatin

Visfatin, visceral adipoz doku tarafından salgılanan bir adipositokindir. NAYKH'nın sonografik sınıflandırması ile visfatin düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Otokrin veya parakrin yolla visceral yağın hızlı birikiminde önemli bir role sahip olabileceği düşünülmektedir [84]. Bir preadiposit hücre hattında visfatinin aşırı ekspresyonu, onun olgun adipositlere farklılaşmasını kolaylaştırır ve glukoz taşınmasının aktivasyonu yoluyla yağ birikimini destekler. Visfatin plazma konsantrasyonlarının NAYKH hastalarında portal inflamasyon varlığını da öngörebileceği belirtilmektedir [85].

TNF- α

TNF- α proinflamatuvar bir sitokindir ve NAYKH'nda hepatik insülin direnci ile ilişkilidir [83]. NASH'lı hastalarda hepatik ve serum TNF- α seviyeleri yükselir ve karaciğer hasarının histolojik şiddeti ile ilişkilidir [86]. Nuclear factor kappa B aktivasyonu ile TNF- α , IL-6 ve IL-1 β gibi proinflamatuvar mediatörler indüklenir. Bu sitokinler de Kupffer hücrelerinin aktivasyonunu sağlar ve NASH'de iltihaplanmaya aracılık eder [49].

IL-1 β

İskelet kası ve karaciğer insülin direncinde rol oynayan yağ dokusu ve karaciğer kaynaklı bir proinflamatuvar sitokindir. Lobüler inflamasyon derecesi ile korelasyon gösterir ve yağlı karaciğerin NASH'a ilerlemesine neden olur [83].

IL-8

Polimorfonükleer lökositleri inflamasyon bölgesine çeken ve monositleri aktive eden bir proinflamatuvar sitokindir. İnsülin direnci bulunan obez bireylerde IL-8 seviyesi artar. Serum IL-8 düzeyi lobüler inflamasyon ve steatoz derecesi ile ilişkili bulunmuştur [83].

PAI-1

Plasminogen activator inhibitör-1 (PAI-1) hem dislipidemi ve insülin direnci dahil olmak üzere NAYKH hastalığının sistemik özellikleriyle hem de NAYKH'nın histolojik şiddetiyle ilişkili bir glikoproteindir. NAYKH'nda kardiyovasküler komplikasyonların bir aracı olabileceği düşünülmektedir [87]. Kısmen artan PAI-1 seviyesi fibrinolitik aktiviteyi azaltarak (hipofibrinoliz) kardiyovasküler hastalık riskini artırır [88].

Hepatosit yaralanması ve inflamasyon

Palmitat, seramid ve diasilgliserol gibi triaçilgliserol öncülleri ve ara ürünleri, hepatositler için zararlıdır. Diasilgliserol, insülin sinyalini bozar ve protein kinaz C'yi aktive eder. Seramid, palmitat üretimini destekler ve sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein – 1c (sterol regulatory element-binding protein – 1c, SREBP-1c)'nin ifadesini yukarı yönde düzenler. Palmitat, endoplazmik retikulum ve oksidatif stresi artırarak lipoapoptoza ve c-jun N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonuna yol açar [89]. Yağdan zengin hücreler endoplazmik retikulum ve mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açan lipid peroksidasyonuna eğilimlidir. Ayrıca serbest kolesterol artınca inflamatuvar aktivasyona ve mitokondriyal disfonksiyona neden olur [90]. Bu lipidlerin aracılık ettiği lipotoksisiteler, NASH'daki hepatosit hasarına neden olur. Hasarlı hepatositler birkaç proinflamatuvar aracıyı serbest bırakır, bağışıklık hücreleri aktive olur ve biyoaktif moleküller serbest bırakılır. Böylece inflamasyon ve hücre ölümü artar [89].

İnflamasom aktivasyonu

İnflamasomlar, hasarlı hücreler tarafından serbest bırakılan veya patojen mikroorganizmalardan türetilen ve iltihaplanmayı tetikleyebilen moleküller ve kaspazlardan oluşan sitoplazmik çoklu protein kompleksleridir. Hasarla ilişkili moleküler kalıplar (damage associated molecular patterns, DAMPs) veya patojen ilişkili moleküler

kalıplar (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) sensörleri olarak işlev görürler [91]. İnflamasyonlar hepatik stellat hücreler üzerinde doğrudan etkiye sahip olabilir ve fibrozu teşvik edebilir [92]. NAYKH’de görülen oksidatif strese, serbest yağ asitlerine ve diğer proinflamatuar metabolitlere yanıt olarak inflamasyonların aktivasyonu, bunun sonucunda IL-1 β üretimi ile PPAR- α ’nın baskılanmasını indükleyerek NASH gelişiminde rol alır ve TNF- α ile indüklenen hücre ölümünün dolaylı etkisini tetikler [93].

Oksidatif stres

Yüksek seviyelerde olan serbest yağ asitleri, obezite ve insülin direnci, ROS’un ve ROS’tan daha uzun yarılanma ömrüne sahip malondialdehitin (MDA) üretimine yol açan mitokondriyal, peroksizomal ve mikrozomal oksidasyon için tetikleyicilerdir. Bu ürünler nükleer hasara, protein denatürasyonuna, fibrozise, indirgenmiş kofaktörlerin oksidasyonuna, lipid peroksidasyonuna ve inflamasyona aracılık etmektedir [94]. Endoplazmik retikulumda protein katlanması, ROS ile alakalıdır. Mitokondriyal disfonksiyon ve sitokrom P450 2E1 (CYP2E1) ile ilişkili endoplazmik retikulum stresi ve aşırı ROS üretimi NAFLD/NASH patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır [95].

Mitokondriyal disfonksiyon

Obezite, insülin direnci, mitokondriyal disfonksiyon ve TNF- α seviyeleri arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir [96]. Mitokondride meydana gelen fonksiyonel ve yapısal değişiklikler NAYKH’nın gelişimine katkıda bulunmaktadır. Fonksiyonel değişiklikler mitokondriyal β -oksidasyonu ve solunum zincirini kapsarken, yapısal değişiklikler ultrastrüktürel ve morfolojik değişiklikler ve mitokondriyal DNA tükenmesini içermektedir [97].

Genetik faktörler

NAYKH gelişimi için yapılmış ikiz çalışmalarına bakıldığında genetik faktörlerin etkili olduğu görülmektedir. Hepatik yağ içeriği için popülasyon tabanlı ikiz çalışmalarında alkolü kötüye kullanmanın veya viral hepatitin olmadığı durumlarda kalıtsal faktörlere bağlı olarak aminotransferaz seviyelerindeki değişkenliğin yarısından fazlasının tahmin edilmesine yol açmıştır. Bu veriler fibroz ve karaciğer yağının kalıtsal ve paylaşılan

özellikler olduğunu göstermektedir [98, 99]. Aile öyküsüne bakıldığında durum pozitif ise ve özellikle her iki ebeveynde bu durum varsa NAYKH riski yüksek olmaktadır [100]. Diğer taraftan etnik kökeninde NAYKH'na duyarlılıkta etkili olduğu görülmüştür. Tip2 diyabet, şişmanlık ve sosyoekonomik faktörleri göz önünde bulundurmaksızın Afrika kökenli Amerikalılarda düşük, Avrupalılarda orta ve Hispaniklerde yüksek NAYKH duyarlılığı olduğu görülmüştür [101].

NAYKH'nın ana ortak genetik belirleyicileri, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (genome-wide association studies, GWAS) çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır. En büyük etkiye sahip olanlardan birinin PNPLA3'ün I148M protein varyantını kodlayan rs738409 C>G tek nükleotit polimorfizmi (SNP) olduğu görülmüştür [102]. I148M varyantı karaciğer hastalığının ilerlemesinin genel bir modülatörü olarak değerlendirilir; artmış hepatik yağ ile ilişkilidir ve Hispaniklerde artan NAYKH riskinin büyük bir kısmını açıklamaktadır [103]. I148M varyantı özellikle pediatrik yaşta fiziksel aktivite eksikliği ve fruktozla zenginleştirilmiş yiyecek ve içeceklerin alımı gibi diyetel faktörler ile etkileşime girmektedir [104]. Bunun yanı sıra aşırı alkol kullanmayanlarda obezite durumu mutasyonların fenotipik ifadesinin en önemli tetikleyicisi olabilmektedir [105]. İnsülin direnci ve obezite durumunda PNPLA3 proteini, hepatik stellat hücrelerinde ve hepatositlerde insülin tarafından indüklenmekte ve lipid damlacıklarının yüzeyinde lokalize olmaktadır ve bu steatoz ile ilişkili mekanizmanın temelini oluşturmaktadır. Özellikle oleik asidin hidrolizine aracılık ederek fosfolipidlerin ve trigliseritlerin yeniden şekillenmesinde rol oynamaktadır [106].

Hepatoselüler lipid kullanımının düzenlenmesinde rol oynayan başka genetik varyantlar da tespit edilmiştir. Transmembrane 6 superfamily member 2 (TM6SF2)'de E167K varyantını kodlayan rs58542926 C>T genotipinin karaciğer hasarına karşı duyarlılığın artmasına neden olduğu ve VLDL lipid sekresyonunu azaltarak hepatik yağ birikimini desteklediği belirtilmiştir [107, 108]. Lands döngüsü olarak adlandırılan araşidonik asit ve diğer doymamış yağ asitlerini dahil ederek fosfatidilinositolün yeniden modellenmesinde rol alan membran bağlı O-asiltransferaz alanı içeren 7 (Membrane bound O-acyltransferase domain-containing 7, MBOAT7) geninin bozulmuş ekspresyonu ise dolaşımda ve hepatositlerde araşidonik asit içeren fosfatidil-inositol seviyelerinin azalmasına neden olmaktadır. MBOAT7 geninin rs641738 C>T varyantı fibroz, inflamasyon ve NAYKH ile ilişkilendirilmelidir [109]. Glukokinaz düzenleyici protein (Glucokinase regulatory

protein, GCKR) geni rs780094 C>T tek nükleotid polimorfizmi NAYKH olan hastalarda yüksek serum trigliserid seviyesi ve karaciğer fibrozu ile ilişkilendirilmiştir [110]. Öte yandan protein fosfataz 1 düzenleyici alt birim 3B (protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B, PPP1R3B) geninin rs4841132 A aleli NAYKH riski taşıyan kişilerde fibroz ve hepatik steatoza karşı koruma ile ilişkili bulunmuştur [111].

Aday gen çalışmaları NAYKH'nın patogenezinde hepatik lipid metabolizmasının diğer yönlerini kontrol eden genlere de dikkat çekmiştir. Lipogenez regülasyonu ve fosfolipid metabolizmasında rol oynayan Lipin1 rs13412852 tek nükleotid polimorfizminin çocuklarda NAYKH riski ile (fibrozun ilerlemesi ve karaciğer hasarının şiddeti) ilişkilendirilmiştir [112]. Mitokondride yağ asidi oksidasyonunu ve redoks durumunu düzenleyen ayırma proteini (Uncoupling protein 2, UCP2) ve Mitokondrial superoksidadz dismutaz 2 (Mn-SOD2) varyantları ise bazı hasta alt gruplarında hastalığın ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir [113, 114].

LYPLAL1, APOB, IRS1, MERTK, MTP, DOS2, ENPP1, IL28B ve irisin gibi diğer gen varyantları da NAYKH ile ilişkilendirilmiştir [115].

Epigenetik faktörler

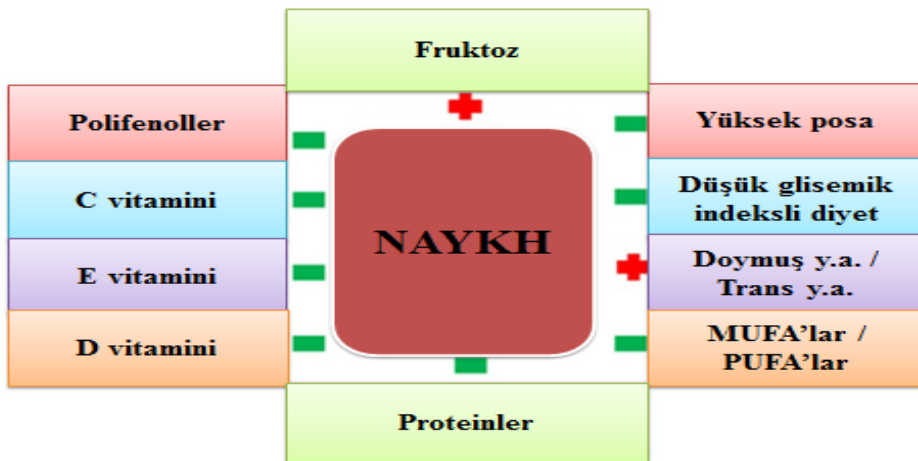
Epigenetik alanı, DNA dizisini değiştirmeden meydana gelen gen fonksiyonunun ve ekspresyonunun modülasyonunu incelemektedir. Epigenetik modifikasyonlara histon proteinlerindeki modifikasyonlar, kodlanmayan RNA'lar gibi RNA bazlı mekanizmalar, DNA metilasyonundaki değişiklikler ve kromatinin yeniden şekillenmesi neden olabilir. Epigenom ise histonların translasyon sonrası modifikasyonları, yüksek dereceli kromatin yapısı ve DNA metilasyonunu içeren hücredeki epigenetik bilgidir [116].

Genetik varyasyon NAYKH varlığı ile ilişkilidir. PNPLA3 genindeki varyasyon NAYKH'na duyarlılıkla bağlantılıdır. DNA metilasyonunun PNPLA3 gen ekspresyonunu düzenlediği görülmüştür. İnsan karaciğer biyopsi örneklerinde PNPLA3'ün düzenleyici bölgesi hipermetile olmuştur. Hastalığın şiddeti arttıkça PNPLA3 mRNA seviyeleri düşmektedir [117]. Mitokondriyal fonksiyonda yer alan önemli bir protein olan mitokondriyal olarak kodlanmış NADH dehidrogenaz 6'nın (MT-ND6) transkripsiyonel aktivitesi ve hepatik DNA metilasyonu arasında da histolojik şiddet ile bir ilişki

bulunmuştur [118]. Ayrıca karaciğer proteinlerini kodlayan genlerin hafif evre NAYKH ile karşılaştırıldığında ileri evre NAYKH'na göre farklı şekilde metillendiği de gösterilmiştir [119].

Diyetsel faktörler

NAYKH'nın başlangıcında ve ilerlemesinde spesifik besin ve besin bileşenlerinin rolü bulunmaktadır. Bir diyetin makro besin ögesi bileşimi, enerji alımından bağımsız olarak NAYKH/NASH ile ilişkilidir. Batı diyeti ile NAYKH pozitif yönde ilişkilidir. Bu diyet türü aşırı miktarda işlenmiş gıdalar, işlenmiş et ürünleri, kırmızı et, atıştırmalıklar, şekerli içecekler, tereyağı ve yumurta tüketimini içerir. Batı diyetini besin öğeleri açısından incelediğimizde yüksek enerji (kalori) yoğunluğu, hayvansal protein, doymuş yağlar (SFA), kolesterol, basit şeker ve tuz içerdiği ve çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) ve posa alımının ise düşük olduğu görülmektedir [120]. Karbonhidratlardan gelen fruktoz ve yağlardan gelen trans yağ asitleri, doymuş yağ asitleri ve ω -6 yağ asitleri NAYKH patogenezi desteklemektedir. Karbonhidratlardan elde edilen posa ve düşük glisemik indeksli diyetler ve ω -3 yağ asitleri ve tekli doymamış yağ asitleri NAYKH patogenezi önler. Diğer besin bileşenleri arasında polifenoller, E vitamini, C vitamini ve D vitamini NAYKH patogenezi önlemektedir (Şekil 2.3) [121].



Şekil 2.3. NAYKH patogenezi destekleyen ve önleyen besin öğelerinin katkısı

MUFA, Tekli doymamış yağ asidi; PUFA, çoklu doymamış yağ asidi. Pozitif (+) işareti NAYKH'ı destekleyen, Negatif (-) işareti NAYKH'ı engelleyen anlamında kullanılmıştır. Ullah et al. 'den uyarlanmıştır [121].

Demir ve selenyum fazlalığının NAYKH'nın şiddetinde rol oynadığı rapor edilmiştir [122]. Yağda çözünen vitaminler, özellikle düşük A vitamini seviyesi NAYKH ile ilişkilendirilmiştir [123].

Doymuş yağ asitleri

NAYKH'nda intrahepatik trigliseritlerin yaklaşık %59'u dolaşımdaki yağ asitlerinden, %26'sı de novo lipogeneze ve %15'i diyet yağından kaynaklanmaktadır. Hepatik lipit girişi böyle iken çıkış şekli değerlendirildiğinde ise VLDL partiküllerinde trigliserit olarak salgılanabilir veya keton cisimcikleri veya karbondioksit üretimine yol açan β -oksidasyonda kullanılabilir olduğu görülmektedir [124].

Toplam enerjinin %10'dan fazlasının doymuş yağ asitlerinden alınması insülin direncini tetiklerken, %10'dan daha azının doymuş yağ asitlerinden alınması plazma trigliserit ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) seviyelerini düşürmektedir. %7'nin altına düşünce ise NASH'ı daha fazla iyileştirmede hatta zararlı olduğu belirtilmektedir [121]. Serbest kolesterol ve serbest yağ asitleri, oksidatif stresi ve endoplazmik retikulum stresini indükleyerek fibrojen ve hepatik inflamasyona neden olur [62]. Doymuş yağ alımı ile glutatyon metabolizması bozulmakta ve oksidatif strese artışa yol açarak NAYKH'nın ilerlemesine neden olmaktadır [125]. NASH'de doymuş yağ asitleri, inflamasyonu tetikler, kaspaz bağımlı bir şekilde hepatositlerden tehlike sinyallerinin salınımını tetikler ve hepatositlerde IL-1 β salınımı için LPS'yi duyarlılaştırır [126]. Farklı doymuş yağ asidi kaynaklarının (örneğin, et ve sütün bileşiminde bulunan konjuge linoleik asit gibi farklı yağ asidi bileşenlerinin etkisi ile de) karaciğerin yağ içeriği üzerinde farklı etkileri olup olmadığı açık değildir. Öte yandan, doymuş yağların etkilerinin hastanın genetik geçmişine bağlı olduğu konusu da değerlendirilmelidir [127].

Demir

Demir alımı toksik hidroksil radikallerinin oluşumunu katalize ettiği için hücresel hasara neden olabilmektedir. Aşırı demir alımı ekstrahepatik hastalık komplikasyonları ve karaciğere bağlı son noktalar açısından NAYKH'nın doğal seyrini kötüleştirmektedir. Vücut demiri azaltıldığında ise insülin duyarlılığı geri kazanılmakta ve bu durum Tip2

diyabet, ileri karaciğer hastalığı ve kardiyovasküler hastalık komplikasyonlarını geciktirmektedir [128].

Adipoz doku demirini karaciğer hasarına bağlayan mekanizmalara bakıldığında adipoz doku lipolizinin artması, adipokinlerin düzensizliği ve adipoz doku inflamasyonu olmak üzere adipoz doku disfonksiyonu ile bağlantılı olduğu görülmüştür. Hemokromatozis geni (HFE) gibi demirle ilişkili genetik polimorfizmlerinde NAYKH patogenezinde katkıda bulunabileceği belirtilmektedir [129].

Fruktoz

Fruktoz, bal ve meyvede bulunan basit bir şekerdir. En çok kullanılan 2 tatlandırıcı olan yüksek fruktozlu mısır şurubu (fruktoz ve glukoz monosakkaritleri) ve sukrozun (sofra şekeri, glukoz ve fruktozun bir disakkariti) önemli bir bileşenidir [130]. Fruktoz, TNF- α ve oksidatif stresin yukarı yönde regülasyonu ile sonuçlanan proinflamatuvar ve lipojenik bir diyet faktörüdür [131]. Yüksek miktarda fruktoz alındığında leptin salınımı inhibe olur ve tokluk sağlanamaz [132].

Fruktoz esas olarak fruktokinaz tarafından metabolize edilirken, glikoz esas olarak heksokinaz veya glukokinaz tarafından metabolize edilir. Fruktokinaz, fruktozu fruktoz-1-fosfata fosforile etmek için ATP'yi ardından D-gliseraldehit ve dihidroksiaseton fosfat üretmek için aldolaz B tarafından metabolizmayı kullanır. Bu aşamadan itibaren glikoz ve fruktoz metabolizması benzerdir ve glikoz, trigliserit ve glikojen üretimi ile sonuçlanmaktadır [130]. Fruktoz glukozdan farklı olarak, metabolize edildiğinde hücre içi fosfat ve ATP seviyelerinde ürik asit üretimi ve nükleotid döngüsü ile ilişkili geçici bir azalma olur. ATP seviyesindeki bu düşüş sonucu oksidatif stres indüksiyonu, protein sentezinde geçici bir bloklama ve fruktoz aracılı etkilerde kilit rolü olan mitokondriyal disfonksiyon dahil bir dizi reaksiyonu indükler [133-135].

Karaciğer, fruktoz alımının yaklaşık %60 oksidasyonunu sağlayarak fruktoz metabolizmasının temel bölgesini oluşturur [120]. Çalışmalara bakıldığında insanlarda fruktozun karaciğerde yağ asidi oksidasyonunu bloke ettiği ve *de novo* lipogenezi uyardığı gösterilmiştir [136-140]. Hayvanlarda ise *de novo* lipogenezi uyardığı ve hepatik β -yağ asidi oksidasyonunu bloke ettiği belirtilmiştir [133, 137, 141]. Akut fruktoz alımı (saatler

içerisinde) metabolik hızı ve termogenezi uyarırken [142, 143], kronik fruktoz alımının (günler-haftalar içerisinde) dinlenme enerji harcamasını azalttığı gösterilmiştir [140]. Fruktoz, adipositokin ve sitokin seviyelerini artırır ve oksidatif stres, insülin direnci ve obeziteye neden olur [144]. NAYKH olan hastalarda, günlük fruktoz alımı artmış fibrozis ile ilişkilidir [145] ve bunun meyve kaynaklı fruktozdan ziyade endüstriyel fruktozdan kaynaklandığı belirtilmektedir [146]. Özellikle aşırı kilolu/obez bireylerde yüksek fruktozlu mısır şurubu ve sükroz gibi fruktoz içeren tatlandırılmış içecekler, artan steatoz ve NASH riski ile ilişkili bulunmuştur [147]. Günde 3 g fruktoz/kg vücut ağırlığı ile normo-kalorik bir diyet, serum trigliserit düzeylerini ve karaciğer yağ birikimini artırır ve yetişkin erkeklerde insülin duyarlılığını azaltır [148].

Vücuda alınan fruktoz, trans yağ asitleri veya TLR ligandları bağırsaktan türetilen sinyalleri etkileyebilir [62]. Fruktoz kinaz nakavt farelerde fruktoz metabolizmasının bağırsakta sıkı bağlantı proteinlerinin bozulmasına yol açtığı bulunmuştur. Buradan fruktoz alımı ile bağırsak geçirgenliğini arttırdığı sonucuna gidilmiştir [149]. Thuy ve diğerleri (2008) tarafından yapılan çalışmada bağırsak geçirgenliğindeki artışın, yağlı karaciğer oluşumu için önemli bir tetikleyici olan endotoksinin portal vene girmesine neden olduğu gösterilmiştir [150]. Fruktoz bağırsak mikrobiyomunu değiştirir ve bu da NAYKH gelişimine ve sıkı bağlantı proteinlerinin kaybı yoluyla bağırsak geçirgenliğini artırıp daha ilerleyici hastalıklara yol açmaktadır [130].

2.2.4. Klinik belirtiler ve laboratuvar bulguları

NAYKH'nın yaklaşık %20'sinde karaciğer enzimlerinde yükseklik saptanmaktadır [151]. Alanin aminotransferaz (ALT) veya aspartat aminotransferaz (AST) gibi kan parametreleri steatoz ve inflamasyon gibi bazı histolojik parametrelerle ilişkilidir [152]. Ancak aminotransferaz seviyeleri fibrozisin derecesi ile korele değildir [153]. Yapılan bir çalışmada ortalama ALT ve AST seviyelerinin obezite ile birlikte arttığı ancak BKİ'den bağımsız olarak gama-glutamil transpeptidaz ve alkalın fosfataz seviyelerinin değişebilir olduğu belirtilmiştir [154]. Başka bir çalışmada ise tanımlanmamış yağlı karaciğerde gama-glutamil transpeptidaz ve ALT seviyeleri ile abdominal çevrenin daha iyi korelasyon gösterdiği bulunmuştur [155].

Kreatin 18 hepatositlerde majör bir ara filament proteini ve serumda immünolojik testle ölçülebilen belirgin bir kaspaz 3 klevajı substratıdır [156]. NASH hastalarında, basit steatozlu hastalardan daha yüksek kreatin 18 fragmanları serum konsantrasyonları tespit edilmiştir [157]. Yapılan bir çalışmada asetil-yüksek mobilite grubu box 1, prokollajen tip-III N-terminal peptidin C-terminal bölünme bölgesi (Pro-C3) ve PNPLA3, rs738409 ile kreatin 18 fragmanlarını birleştiren bir model ile NAYKH'lı hastalarda kreatin 18'in NASH tanısının doğruluğunu önemli ölçüde geliştirdiği bulunmuştur [158].

Sağlıklı obez bireylerde düşük adiponektin seviyeleri alkolsüz hepatik steatoz ile yakından ilişkili bulunmuştur [159]. Değerlendirilmesi gereken metabolik belirteçler arasında proaterojenik serum lipid profili, idrar mikroalbümini, serum ferritin (normalden 1.5 kat yüksek), ürik asit (NAYKH'lı hastaların %20'sinde hiperürisemi bulunmaktadır) ve yüksek duyarlılık C-reaktif protein düzeyleri ve ayrıca proinsülin, insülin, açlık kan glukozu ve C-peptid düzeyleri bulunmaktadır [160, 161].

Bağırsak mikrobiyotasındaki varyasyonlar da hem NAYKH hem de obezite ile ilişkilendirilmiştir [161]. Yapılan bir çalışmada hem düşük BKİ'ye sahip sağlıklı kontrol grupları hem de basit steatoz olanlar ile karşılaştırıldığında NASH hastalarında daha düşük Bacteriodes yüzdesi ve dışkı yüzeyinde daha yüksek Clostridium kokoidleri belirlenmiştir [26].

2.2.5. Tanı kriterleri

NAYKH'daki olumsuz sonuçların en önemli belirleyicisi, NASH'ın histolojik özelliklerinden ziyade fibrozisin varlığıdır [22]. NASH hastalarında morbidite ve karaciğere bağlı mortalitenin ana belirleyicisi ileri fibrozistir. Histolojik değerlendirme için karaciğer biyopsisi altın standart olmasına rağmen NASH şüphesi olan hastalarda fibrozis taraması önerilmektedir [162]. NAYKH tanısı için kullanılan, invaziv olmayan biyobelirteçler ve görüntüleme teknikleri Çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. NAYKH tanısında kullanılan biyobelirteçler ve görüntüleme teknikleri

Teşhis Aracı	Teknik / İlke	Özellikler
Serolojik Testler	AST	Bazı NAYKH hastalarında AST ve ALT normal olduğu için yükselmiş seviyeler NAYKH belirtisi değildir [49].
	ALT	
	AST/ALT	>1 olması fibrozisi öngörmeyi sağlar [49, 163].
Görüntüleme teknikleri	Ultrasonografi	Steatoz, hepatositlerin >%30'u olduğunda hassastır; Steatoz ve NASH arasında ayrım yapmaz [49].
	CT MRI	Ultrasonografiden daha hassas, Steatoz ve NASH arasında ayrım yapılamaz, Pahalıdır [49].
	Fibroscan	Karaciğer sertliğini ölçen morfolojik bir yöntemdir. Fibrotest ve APRI ile benzer performansla sahiptir. Fibrozu tespit edebilir ancak pahalıdır. Fibrotest ile birlikte kullanımı önerilmektedir [49, 164].

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, CT: Bilgisayarlı tomografi, MRI: Manyetik rezonans görüntüleme, Fibroscan: Geçici elastografi, NASH: Alkolik olmayan steatohepatit, NAYKH: Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı.

Hepatik fibrozisi değerlendirmek için invaziv olmayan testler ve önerilen skorlamalar ise aşağıda belirtilmiştir.

FIB-4 skoru

Standart biyokimyasal değerler (AST, ALT, trombosit) ve yaşı birleştiren, FibroTest sonuçlarıyla uyumlu ve basit, ucuz ve invaziv olmayan bir testtir [165]. FIB-4 skoru formülasyonu aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır [166].

$$\text{FIB-4} = \frac{\text{Yaş (yıl)} \times \text{AST (U/L)}}{\text{Trombosit sayımı (10}^9\text{/L)} \times [\text{ALT(U/L)}]^{1/2}} \quad (2.1)$$

APRI

Karaciğer fibrozunun AST ve trombosit sayısı üzerindeki karışık etkilerini arttırmak için AST – trombosit oranı indeksi (APRI) geliştirilmiştir [167]. NAYKH olan hastalarda APRI değerleri fibrozisin derecesi ile artma eğiliminde olup, bu hastalıkta da faydalı olabileceği belirtilmektedir [168].

APRI formülasyonu aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır [166].

$$APRI = \frac{AST(/ULN^*)}{Trombosit\ sayımı\ (10^9/L)} \times 100 \quad (2.2)$$

*ULN: ölçüm yapılan laboratuvar için normal değerin üst sınırıdır.

ELF skoru

Tek hepatik matriks metabolizması belirteçlerinden oluşan Enhanced Liver Fibrosis (ELF) skoru, ticari olarak temin edilebilen ilk serum multimarker fibrozis testlerinden birisidir. Kronik karaciğer hastalığında fibrozis evrelemesi için değerli bir araçtır. Ancak, yaş ve cinsiyet gibi etki faktörleri dikkate alınmamaktadır. ELF skoru metallo-proteinaz-1 (TIMP-1), tip III prokollajen (PIIINP) ve hyaluronik asidin amino-terminal propeptidinin doku inhibitörünün kantitatif serum ölçümlerini birleştiren bir algoritma kullanarak tek bir değer sağlamaktadır. ELF puanı için kullanılan formülasyon aşağıda gösterilmiştir [169].

$$ELF\ skoru = 2.494 + 0.846 \ln(C_{HA}) + 0.735 \ln(C_{PIIINP}) + 0.391 \ln(C_{TIMP-1}) \quad (2.3)$$

NAFLD fibroz skoru

Bu skor ile NAYKH'lı hastalarını 6 değişkenli bir puanlama sistemi kullanarak (hiperglisemi, yaş, trombosit sayısı, vücut kitle indeksi, AST/ALT oranı ve albümin) ileri fibrozlu ve ileri fibrozsuz şeklinde kesin olarak ayırarak hastaların önemli bir kısmında ileri fibrozun tanımlanması için karaciğer biyopsisini gereksiz kılmaktadır. NAFLD fibroz skorlama formülü aşağıdaki gibidir.

$$\text{NAFLD Fibroz Skoru} = 1.675 + 0.037 \times \text{yaş (yıl)} + 0.094 \times \text{BKİ (kg/m}^2\text{)} + 1.13 \times \text{IGF/diyabet (evet=1, hayır=0)} + 0.99 \times \text{AST/ALT oranı} - 0.013 \times \text{trombosit (x 10}^9\text{/l)} - 0.66 \times \text{albümin (gr/dl)} \quad (2.4)$$

*IGF: Bozulmuş açlık glikozu

Skorlama sonucunun -1.455'ten düşük olması ciddi bir fibroz olmadığını, 0.676'dan yüksek olması şiddetli bir fibroz varlığını gösterebilir. Her iki değer arasında bir puan elde edilmesinin ise karaciğer biyopsisi gerektirdiği belirtilmektedir [170].

BARD skoru

Mevcut klinik veriler ile (BKİ, AST, ALT ve diyabet) yapılan skorlamada diyabetik olmayanlar arasında ileri fibrozisin varlığını güvenilir bir şekilde dışlayabileceği öngörülmektedir. BARD skoru 3 değişkenden oluşmaktadır: AST/ALT oranı $\geq 0.8 = 2$ puan, BKİ $\geq 28 = 1$ puan ve diyabet varlığı = 1 puan. Olası puan 0-4 arasında değişmektedir. 0-1 puan şiddetli fibrozis için yüksek bir negatif prediktif değere sahip olduğunu göstermektedir [171].

CA indeksi

Tip IV kollajen 7S ve AST'yi kullanan CA indeksi diye isimlendirilen skorlama sistemi, NAYKH hastalarında hem NASH hem de ilişkili fibrozu yeterli doğrulukla tahmin edebilen uygun bir tanı ve tarama aracı olabileceği öne sürülmektedir. Kesim noktaları sırasıyla 6.96 ve 9.51 olarak belirlenen CA indeksi NASH ve NASH ilişkili fibrozis puanlama sistemi aşağıdaki gibidir [172]:

$$\text{CA indeksi} - \text{NASH} = 0.994 \times \text{Tip 4 kollajen 7S (ng/ml)} + 0.0255 \times \text{AST (IU/l)} \quad (2.5)$$

$$\text{CA indeksi} - \text{fibrozis} = 1.5 \times \text{Tip 4 kollajen 7S (ng/ml)} + 0.0264 \times \text{AST (IU/l)} \quad (2.6)$$

Forns testi

Yaş, gama glutamil transferaz (GGT), kolesterol ve trombosit sayısını birleştiren ve önemli karaciğer fibrozu olmayan hastaları belirlemede yararlı olan bir model ve skor sistemidir. Forn test puanlama sistemi aşağıdaki gibidir:

$$7.8113.131.\ln(\text{trombosit sayısı})+0.781.\ln(\text{GGT})+3.467.\ln(\text{yaş})-0.014.(\text{kolesterol}) \quad (2.7)$$

Önemli fibrozisin yokluğunu (4.21'den az) ve varlığını (6.9'dan büyük) belirlemek için iki eşik değer belirlenmiştir [173].

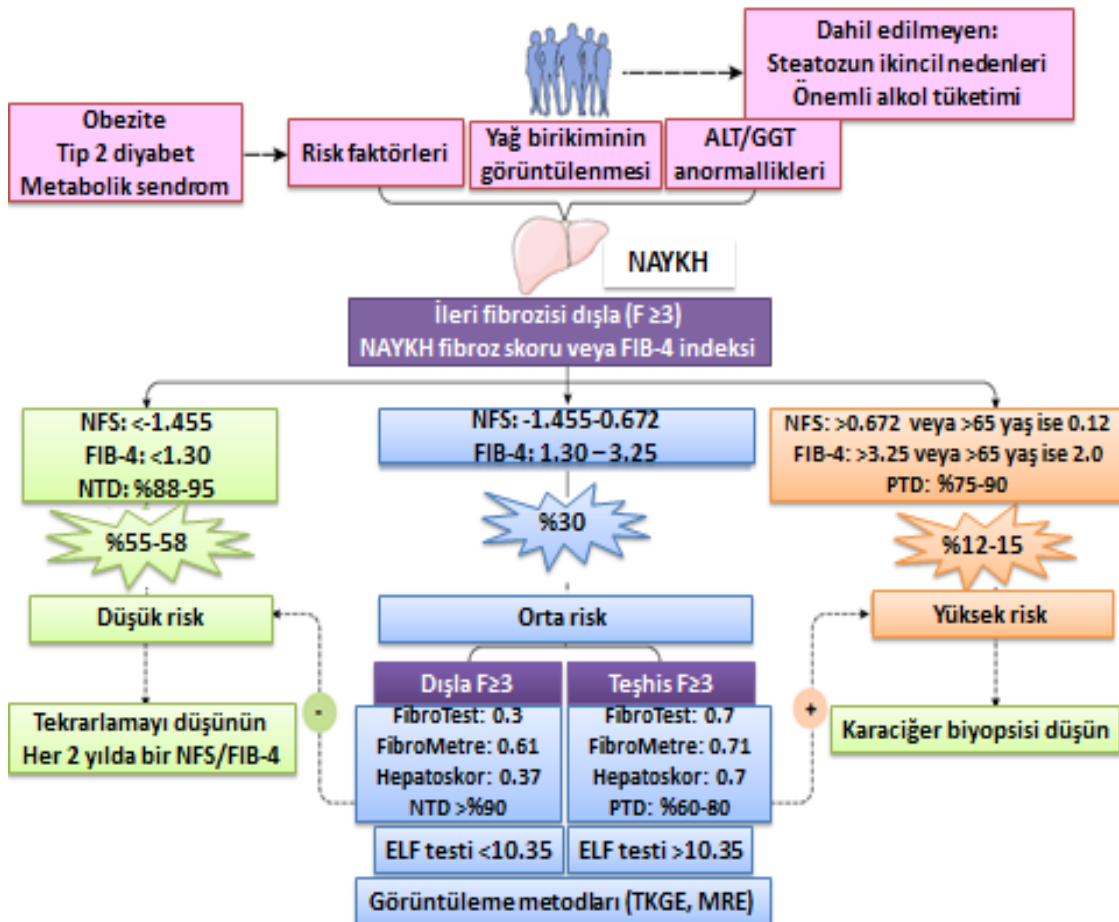
Fibrotest (Biopredictive SAS, Paris, Houilles, France)

Birkaç septadan siroza kadar değişen önemli fibrozisin teşhisi için (Fibrotest) basit serum biyokimyasal belirteç kombinasyonlarının öngörücü değeri, yapılan bazı çalışmalar ile gösterilmiştir. Klinik olarak anlamlı fibrozisin teşhisi için 11 serum biyokimyasal belirtecin (α_2 makroglobulin, α_1 globulin, α_2 globulin, AST, ALT, GGT, total bilirubin, albümin, γ globulin, globulin, apolipoprotein A₁) kombinasyonu ve yaş ve cinsiyet birlikte değerlendirilmiştir. Beş biyokimyasal belirtecin (α_2 makroglobulin, α_2 globulin (veya haptoglobulin), γ globulin, apolipoprotein A₁ ve GGT) hepatit C ile ilişkili fibrozun şiddetini öngördüğü gösterilmiştir [174]. Başka bir çalışmada kronik hepatit C'li hastalarda tedavilerin antifibrotik etkisinin bir belirteci olarak 5 biyokimyasal belirteç (α_2 makroglobulin, haptoglobulin, apolipoprotein A₁, GGT ve cinsiyet ve yaşa göre ayarlanmış toplam bilirubin) ve hyaluronik asidi birleştiren bir fibrozis indeksi oluşturulmuştur [175]. Aynı yıl yayınlanan bir başka çalışmada ise yine 5 biyokimyasal belirteç (α_2 makroglobulin, haptoglobulin, apolipoprotein A₁, GGT ve toplam bilirubin) kullanılarak, cinsiyet ve yaşı da içeren hepatit C ile ilişkili önemli fibrozu doğru bir şekilde tahmin ettiği belirtilen bir indeks ortaya konmuştur [176]. Peginterferon alfa-2b ve ribavirin kombinasyonunun histolojik özelliklerin belirteçleri olarak kullanılabileceği de başka bir çalışma sonucunda gösterilmiştir [177]. Thabut ve diğerleri (2003) ise yine α_2 makroglobulin, haptoglobulin, apolipoprotein A₁, GGT ve toplam bilirubin kullanarak Fibrotest uygulamışlardır. Ancak HCV genotipine göre değişen serum kolesterolünü içermeyi için (viral eradikasyondan sonra artan kolesterol seviyeleri genotip3 olan

hastalarda daha düşüktür) diğer indekslere göre daha doğru bir tahmin elde ettiklerini belirtmişlerdir [178].

Fibrometre ve Hepatoskor

Fibrotest gibi değişkenleri birleştirerek; klinik olarak anlamlı fibroz için yüksek bir tanısal doğruluğa sahip fibrometre ve yaş, cinsiyet ve 4 serum belirtecinden oluşan bir model olan hepatoscore geliştirilmiştir [179, 180]. Öngörülen bazı kurallar ve kan bazlı biyobelirteçler kullanılarak ileri fibrozisli ve NAYKH olan hastaları non-invaziv değerlendirmek için oluşturulan algoritma aşağıda belirtilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. NAYKH ve ileri fibrozisli hastaları non-invaziv olarak değerlendirmek için algoritma [181]

ALT, alanin aminotransferaz; GGT, gamma-glutamil transferaz; MRE, manyetik rezonans elastografi; NAYKH, alkolik olmayan karaciğer yağlanması; NFS, NAYKH fibroz skoru; NTD, negatif tahmin değeri; PTD, pozitif tahmin değeri; TKGE, titreşim kontrollü geçici elastografi. *Düşük, orta ve yüksek risk grupları için tahmini yaygınlık

2.2.6. Histopatolojik bulgular

Karaciğer biyopsisi NAYKH tanısı için altın standarttır ve invazivdir. Karaciğer dokuları histolojik olarak değerlendirilir. Steatoz, iltihaplanma ve balonlaşma gibi hepatik lezyonlar derecelendirilir ve fibroz aşamalandırılır [49]. Biyopsinin temel amacı NASH ve NAFLD arasında ayırım yapmaktır [50].

Fibrozisin evrelemesi aşağıdaki gibidir [182].

Çizelge 2.2. Fibrozis derecesi (evreleme)

Evre	Histolojik Bulgular
0	Fibrozis yok
1a	Bölge 3, Perisinüzoidal fibroz, özel boyama (yani EvG*)
1b	Bölge 3, Perisinüzoidal fibroz, H&E ile tespit edilebilir
1c	Sadece periportal / portal fibrozis
2	Bölge 3, Artı portal / periportal fibrozis
3	Yukarıdaki gibi, ancak köprüleme fibrozu ile
4	Siroz

*EvG: Elastica-van-Gieson

Fibrozisin derecesine göre evreleme (Kleiner vd. sonra) ayrıca değerlendirilmelidir: Evre 1, hafif santral fibrozisli 1a ve santral ven sklerozu ile birlikte dens perisinüzoidal fibrozisli 1b ve bitişik perisinüzoidal fibröz uzantısı olmak üzere ikiye ayrılır. Evre 1c, yalnızca erken bir aşamada kesinlikle ortaya çıkabilecek portal fibrozis için kullanılır. Evre 2 portal ve santral fibrozistir. Kronik hepatitin evrenmesine benzer şekilde, evre 3 fibrozis arasında köprü kurar ve evre 4 siroza karşılık gelir [182].

Karaciğer biyopsisini değerlendirmek için skollama sistemleri aşağıda belirtilmiştir.

Brunt sınıflaması

Yağlı dejenerasyon, hepatositlerdeki hasar belirtileri ve enflamatuvar değişiklikler yarı nicel olarak toplanıp Brunt skoru elde edilir. NAS (NAYKH aktivite skoru) ise Brunt skorunun bir iyileştirmesidir ve üç bileşenin (steatoz, lobüler inflamasyon ve hepatosit balonlaşması)

ayrı ayrı nicelleştirilmesiyle toplam bir skor elde edilir [182]. Derecelendirme için değerlendirme ve yarı niceliksel analiz Çizelge 2.3’de belirtilmiştir [182].

Çizelge 2.3. Brunt sınıflaması bileşenleri

Yağlı dejenerasyon derecesi:	
<%5	= Derece 0
%5-33	= Derece 1
%34-66	= Derece 2
>%66	= Derece 3
Lobüler İnflamasyon Derecesi:	
Yok	= Derece 0
Görüş alanı başına en fazla 2 odak (x200 büyütme)	= Derece 1
Görüş alanı başına 2 – 4 odak	= Derece 2
Görüş alanı başına >4 odak	= Derece 3
Lipogranülomlar inflamasyon kategorisine dahildir	
Balonlaşma:	
Yok	= Derece 0
Birkaç balonlu hepatosit	= Derece 1
Birçok balonlu hepatosit	= Derece 2

NASH aktivite derecelendirmesi Çizelge 2.4’te belirtilmiştir [183].

Çizelge 2.4. NASH aktivite derecelendirmesi

Aktivite	Steatoz	Balonlaşma	İnflamasyon
Hafif: Derece 1	1-2 (%66’ya kadar)	Minimal	Lobular: 1-2
			Portal: hiç – hafif
Orta: Derece 2	2-3 (>%33, bazen >%66)	Net	Lobular: 2
			Portal: hafif – orta
Şiddetli: Derece 3	3 ($\geq$ %66)	Belirgin	Lobular: 3
			Portal: hafif – orta

Steatoz: Derece 1, $\leq$ %33; Derece 2, >%33, <%66; Derece 3, $\geq$ %66

Bu puanlama sistemi kolaylıkla tekrarlanabilmektedir ve steatohepatitin teşhis edilip edilmeyeceğine karar vermek için temel sağlayabilmektedir: “0-2 puan, kesinlikle steatohepatit yok; 3-4 puan, şüpheli; ≥ 5 puan, kesin steatohepatit” şeklinde skorlanmaktadır.

Kleiner sınıflaması (NAS / NAFLD aktivite skoru)

Kleiner vd., balonlaşma, steatoz ve lobüler inflamasyon derecesine dayalı olarak (NAS skorum sistemi) NAYKH'nın histopatolojik lezyonlarını evreleme ve derecelendirme sistemini tanıtmışlardır [184]. Bu sistem, terapötik denemeler sırasında NAYKH'ndaki değişiklikleri ölçmek için bir araç olarak geliştirilmiştir ve günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır [50]. NAS skoru, araştırmacılar ve klinisyenler için NAYKH lezyonlarını sistematik olarak karakterize etmektedir; insülin direncinin (HOMA-IR) homeostaz değerlendirmesi ve aminotransferaz seviyeleri ile güçlü bir korelasyon göstermesine rağmen prognostik değeri tartışılmıştır [185].

NAYKH aktivite skoru steatoz, lobüler inflamasyon ve hepatoselüler balonlaşmanın toplamıdır ve NASH'lı hastaların çoğu ≥ 5 NAYKH aktivite skoruna sahiptir [50].

SAF skoru ve FLIP algoritması

Steatoz, aktivite ve fibroz (SAF) skoru, steatozu fibroz ve inflamasyondan ayırt edebilmiştir. Bu nedenle, doğruluk ve tekrarlanabilirlik ile karakterize edilirken, karaciğer histopatolojisinin tanımını basitleştirmek için bir alternatif olarak önerilmiştir. Önerilen Yağlı Karaciğer İlerleme İnhibisyonu (Fatty Liver Inhibition of Progression, FLIP) algoritması, fibroz ve balonlaşmanın karakterizasyonunu arttırmakta ve gözlemciler arası değişkenliği azaltmaktadır (Çizelge 2.5) [186].

Çizelge 2.5. Alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalığında karaciğer biyopsisini değerlendirmek için SAF skortlama sistemi [186]

Bileşenler	Skor	Tanımlama
Steatoz	S0	Yok
	S1	%5-%33
	S2	%34-%66
	S3	>%66
Aktivite:	A0-A4	
Balonlaşma	0	Yok
	1	Yuvarlak şekilli ve soluk ve/veya ağsı sitoplazmalı hepatosit kümeleri
	2	
Lobular inflamasyon	0	Büyütülmüş hepatositli skor 1 ile aynı
	1	(>2_normal boyut)
	2	0: Yok
Aktivite derecesi*	1	1: 20/hedef alan başına <2 odak
	2	2: >20 hedef alan başına 2 odak
	3-4	hafif aktivite
		orta aktivite
		şiddetli aktivite
Fibroz	F0	Belirgin fibroz yok
	F1a	Hafif bölge 3 perisinüzoidal fibroz
	F1b	Orta bölge 3 perisinüzoidal fibroz
	F1c	Sadece portal fibroz
	F2	Bölge 3 ve periportal perisinüzoidal fibroz
	F3	Fibroz köprüleme
	F4	Siroz
S ₀₋₄ A ₀₋₄ F ₀₋₄		

*Aktivite derecesi: Lobüler iltihaplanma ve balonlaşma puanlarının toplamı

Matteoni sınıflaması

Matteoni ve arkadaşları ise NAYKH için histopatolojik bulguları 4 tipe ayırarak değerlendirmişlerdir. Matteoni sınıflaması Çizelge 2.6'da belirtilmiştir [187].

Çizelge 2.6. Alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalığında karaciğer biyopsisini değerlendirmek için Matteoni sınıflaması

Sınıflama	Histopatolojik bulgular
Tip I	İltihabi infiltrasyon yok, sadece yağlanma mevcut
Tip II	Lobular iltihabi infiltrasyon + yağlanma
Tip III	Hepatositlerde balonlaşma + yağlanma
Tip IV	Hepatositlerde balonlaşma + yağlanma + fibrozis veya Mallory cisimcikleri

Mendler sınıflaması

Mendler ve arkadaşlarının geliştirdiği skora sisteminde ise portal fibrozis, mallory cisimcikleri, lobüler inflamasyon ve nekroz, perisinüzoidal fibroz, hepatosit balonlaşması puanlamaları ve yağ değişimi değerlendirilmiştir. Mallory cisimcikleri (0-3), lobüler inflamasyon ve nekroz (0-3), perisinüzoidal fibroz (0-3) ve hepatosit balonlaşmasının (0-3) toplamı ile bir aktivite skoru oluşturulmuştur. Portal fibrozis skoru (0-6) ve aktivite skoru (0-12) kullanılarak derecelendirme (Çizelge 2.7) yapılmıştır [188].

Çizelge 2.7. Alkolik olmayan karaciğer yağlanması hastalığında karaciğer biyopsisini değerlendirmek için Mendler sınıflaması

Derece 1	Derece 2	Derece 3
Portal fibrozis: 0-2 Aktivite skoru: 0-4	Portal fibrozis: 3 Aktivite skoru: 5-7	Portal fibrozis: 4-6 Aktivite skoru: 8-12

2.2.7. Bağırsak mikrobiyotası ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığındaki rolü

Mikrobiyota

İnsan bağırsağı yaklaşık 1-2 kg kütleye sahip olan karmaşık bir ekosistemdir [14]. Mikrobiyota; canlı mikrobiyal bir topluluğu ifade edip virüs, bakteri ve Archaea ve Eukarya yaşam alanı üyelerini içermektedir [189]. Mikrobiyota bileşimi doğumdan yaşlılığa kadar belirgin bir şekilde değişmektedir [5].

Bağırsak mikrobiyotası bakteriyel translokasyon, mukozal bağışıklık sistemi ve vitamin üretiminde önemli rollere sahiptir [14]. Böbrek, beyin ve karaciğer gibi ekstraintestinal organların fonksiyonlarını dolaylı olarak düzenler ve bağırsak fonksiyonlarını direk olarak

regüle eder [27]. Bağırsak mikrobiyotası lipidler, glukoz veya safra asitlerinin *de novo* sentezi için kullanılabilen veya metabolize edilebilen kısa zincirli yağ asitlerinin (KZYA) üretiminde ve polisakkarit fermantasyonunda görev almaktadır. Ayrıca LPS'lerin taşınmasını sağlayarak endotoksemiye karşı bağırsak bariyer fonksiyonunu korumaktadır [190].

Mikrobiyotada üretilen metabolitler metabolik hastalıklarda olumlu ve olumsuz yönde görev almaktadır. Bağırsak lümeninde *Bifidobacterium* ve *Akkermansia*'nın KZYA ürettiği bilinmektedir. KZYA'ların diyet lifleri ve prebiyotiklerle üretimi artmakta olup, artan tuz tüketimi ile üretimi azalmaktadır. KZYA'lar bağırsak bariyer fonksiyonunu arttırmakta ve yağ kütlesini azaltmaktadır [191]. Nitekim *Akkermansia muciniphila* takviyesi insanlara uygulandığında iyi tolere edilebilir ve güvenli olduğu, insülin duyarlılığını arttırdığı ve karaciğer disfonksiyonu ile ilgili kan belirteçlerini düşürdüğü belirtilmiştir [192]. Aromatik amino asitlerden olan triptofandan üretilen ve bakteriyel bir metabolit olan indolün LPS'nin zararlarını ve hepatik inflamasyonu azalttığı bulunmuştur [193]. Mikrobiyotada üretilen bir diğer metabolit olan imidazole propiyonat, insülin reseptörü sinyal yolunu bloke ederek insülin direncinin başlamasına katkıda bulunmakta ve glukoz toleransını bozmaktadır [194]. Bağırsak mikrobiyotasında üretilen trimetilamin N-oksit (TMAO)'ın ise vasküler inflamasyonu arttırdığı ve kardiyovasküler hastalıkların ilerlemesini sağladığı belirtilmektedir [195].

İnülin, oligofruktoz ve galaktooligosakkaritler (GOS) gibi diyet lifleri mikrobiyotadaki zararlı türleri bastırıp yararlı bakteri oranını arttırmaktadır. Meyve / şarap ve çaydaki polifenoller, yüksek posalı diyet ve yağ oranı %28-35 civarında kalan bir diyet, enerji dengesini modüle etmekle ilişkili olan Firmicutes / Bacteroides oranını azaltırken doymuş yağlar ve yağlı bir diyet (%44-72) bu oranı arttırmaktadır [196]. Akdeniz diyetinin NAYKH olanlarda visceral obezite, aşırı kilo ve serum transaminase tedavisinde etkili bir yöntem olduğu da belirtilmektedir [197]. Diyet posa alımı arttıkça hepatik steatozda iyileşme ve karaciğer enzimlerinde azalma gerçekleşmektedir [198]. D vitamini de immünomodülatör özelliğe sahip olup yararlı bakteri oranını arttırmaktadır [196].

Bağırsak – karaciğer eksen

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı, ince bağırsakta bakteriyel çoğalma, bağırsak mikrobiyotasında değişiklikler ve bağırsak geçirgenliği sonucu plazma endotoksin seviyelerinin artması ile ilişkilidir. Bağırsakta üretilen endotoksinler, hepatoselüler hasar ile ilişkili moleküller ve lipit ve lipit metabolitleri makrofaj aktivasyonuna katkıda bulunmaktadır [199]. Bağırsak florası dengesi bozulduğunda intestinal endotoksemiye neden olup NAYKH ilerlemesini sağlayabilmektedir [200].

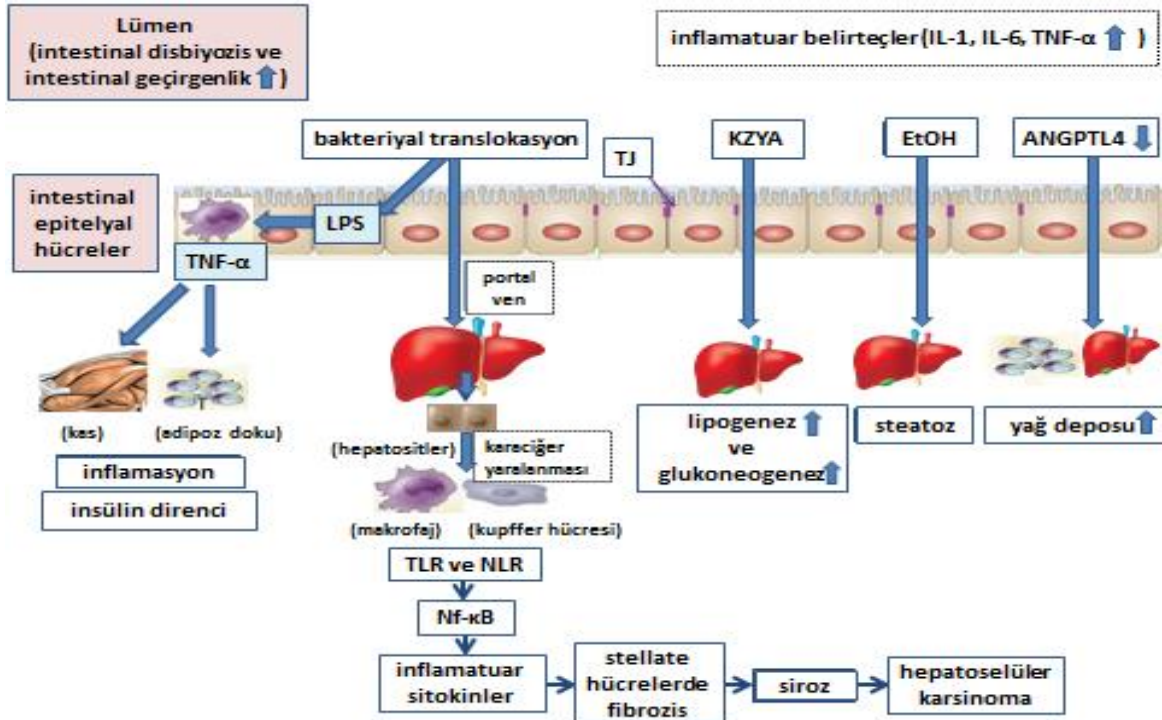
Bağırsak-karaciğer aksı teorisi ilk kez 1998 yılında Marshall tarafından önerilmiştir [201]. Bağırsak ve karaciğer arasında hepatik portal sistem vasıtasıyla anatomik olarak bir bağlantı vardır. Bu bağlantı vasıtasıyla bağırsak mikrobiyotası ve oluşan metabolik ürünler karaciğer patolojisini etkileyebilmektedir [200]. Bağırsak mikrobiyal antijen ve metabolitleri ile sindirim sistemindeki çoğu metaboliti içeren, portal ven yoluyla karaciğer kanının yaklaşık %70'i sağlanmaktadır [202].

Bağırsaklar ve karaciğer (bağırsak-bağırsak mikrobiyota-karaciğer eksen) portal ven yoluyla doğrudan bağlantılıdır. Dolayısıyla karaciğer, bağırsak kaynaklı toksik faktörlere (bakteri, bakteriyel ürünler ya da hasarlı metabolitler) maruz kalan ilk organdır [14]. Yutulan ksenobiyotikler, portal dolaşım yoluyla karaciğere taşınmadan önce bağırsak mikrobiyotası ile etkileşime girdiği için, ilaç metabolizmasını düzenlemekte mikrobiyota önemli rol oynamaktadır [203]. Midesinde *Helicobacter pylori* kolonizasyonu bulunan hastalarda, Parkinson hastalığının tedavisi için kullanılan Leva-dopa (L-dopa)'nın biyoyararlanımının azalması buna örnektir [204].

Karaciğerde parankimal olmayan Kupffer hücreleri ve monosit türevli makrofajlar bulunmaktadır. Karaciğerde yerleşik bir makrofaj topluluğu olan Kupffer hücreleri fagositik özelliğe sahiptir, hücreler arası etkileşimi sağlar, enflamasyonu başlatır ve kan kaynaklı monositlerin toplanmasına yardımcı olur [199]. Lipopolisakkaritlere hepatositlerden daha fazla yanıt verir [16]. Monosit türevli makrofajlar ise bağışıklık sisteminin anahtar bir bileşenidir [199]. TLR, sistemik inflamasyona abartılı inflamatuvar yanıtları dönüştürebilir [44].

Bağırsak epitelinde bulunan tight junctionlar, antimikrobiyal moleküller (örneğin Regenerating islet-derived protein 3 β / Reg3b) ve kalın bir mukus tabakası (örneğin Muc-2) metabolik ürünler ve bakterilere karşı doğal bir bariyer oluşturmaktadır. Bu koruyucu mekanizmalar endojen faktörler (örneğin endocannabinoidler, TNF), zararlı ajanlar (örneğin dekstran sülfat sodyum) ve diyet faktörleri (örneğin yüksek yağ alımı) tarafından zarar görebilmektedir [205]. Bağırsakta geçirgenliğin artması ve bağırsak disbiyozu sonucu PAMPs (aynı zamanda fibroz gelişimini sağlayan stellate hücrelerini de aktive eder) ve mikrobiyal ilişkili moleküler kalıplar (microbial-associated molecular patterns, MAMPs) ile ilişkili DNA ve hücre duvar komponentlerini (β -glukan ve endotoksinler) içeren mikrobiyal ürünlerin ve mikroorganizmaların translokasyonu gerçekleşir [8]. Bakteriyel translokasyon, bakteriyel endotoksinlerin (e.g. lipopeptid, peptidoglikan, LPS) veya canlı mikroorganizmaların bağırsak lümeninden ekstraintestinal bölgelere ve mezenterik lenf düğümlerine göç etmesidir. Bakteriyel translokasyon karaciğer yetmezliği ile ilişkilidir ve ilerlemiş karaciğer hastalığında belirgindir [46].

Antijenler tight junction bağlantılarından geçer ve adaptif bağışıklık sistemini etkinleştiren T hücre yanıtını modüle eder veya dendritik hücreler tarafından tanınır. PAMPs'ın minimum konsantrasyonları (flagelin, peptidoglikanlar ve LPS) TLR'ler ve nod-benzeri reseptör'ler (nod-like receptor, NLR) vasıtasıyla NF- κ B'yi aktive eder. Nükleer faktör kappa B ise portal dolaşıma giren kemokinlerin ve inflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olur [16]. Bağırsakta gerçekleşen disbiyozise karşı karaciğerde oluşan immün yanıt Şekil 2.5'te gösterilmiştir [206].



Şekil 2.5. Bağırsakta oluşan disbiyozise karşı karaciğerde oluşan immün cevap [206] Bağırsak lümeninde genetik faktörler, enfeksiyon, spesifik ksenobiyotikler, alkol, yaralanma ve yüksek fruktozlu diyet ve yüksek lifli beslenme gibi sebepler sonucu intestinal disbiyozis gerçekleşir ve intestinal geçirgenlik artar. Bakteriye translokasyon ile PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), MAMPs (microbial-associated molecular patterns), bakteri, VOCs (volatile organic compound), DAMPs (damage-associated molecular patterns), patojenler vb ürünler tight junctionlardan geçip portal ven vasıtasıyla hepatositlere ulaşır ve hepatocellular karsinoma ile sonuçlanan hasarlara neden olabilir. İntestinal epitelyal hücrelere geçen lipopolisakkaritler metabolik endotoksemi oluşturup kas ve adipoz dokuda inflamasyon ve insülin direncine neden olur. Lümeninden geçen EtOH, ROS (reaktif oksijen türleri) üretimini arttırabilir ve karaciğerde steatoza neden olur. KZYA; GPR41 ve GPR43 bağımlı mekanizmaları aktive eder, karaciğerde de novo lipogenesis ve glukoneogenesis için substrat olarak hareket eder. Lümeninde ANGPTL4'ün azalması ile de adipoz doku ve karaciğerde yağ depolanması artar. TLR, toll-like reseptör; NLR, nod-like reseptör; TJ, tight-junction; ANGPTL4, lipoprotein lipaz inhibitörü; LPS, lipopolisakkarit; SCFA, kısa zincirli yağ asidi; TNF-α, tümör nekrozis faktör-α; Nfκβ, nükleer faktör kappa-β.

Karaciğerin enzimatik aktivitesinde oluşan bir değişiklikte bağırsak mikrobiyotası ile ilişkilendirilmiştir [203]. Karaciğer yaralanması veya hastalığı durumunda bağırsaktaki mikrobiyal disbiyoz artabilmektedir. Karaciğerde üretilen inflammatuar faktörler bağırsak mukozasında geçirgenliği arttırır. Diğer taraftan bağırsak bariyer fonksiyonu zarar gördüğü zaman, bağırsaktaki bakteriler ve ürünleri portal ven yoluyla karaciğere taşınıp karaciğerdeki bağışıklık sistemine daha çok zarar vermeye başlar [202].

FIAF teoremi

Germ-free (mikropsuz) hayvanların diyetle bağılı obeziteden korunmasının mekanizmalarından birisi de angiopoietin-like protein 4 olarak bilinen açlığa bağılı yağ faktörünün (fasting-induced adipose factor / FIAF) yüksek seviyeleridir. FIAF, dolaşımdaki bir lipoprotein lipaz inhibitörüdür ve karaciğer, bağırsak ve yağ dokusu tarafından üretilir [207]. Germ-free FIAF -/- fareler yüksek karbonhidratlı yüksek yağlı diyetle beslendiklerinde obeziteden korunamaması, enerji depolanmasının mikrobiyal düzenlenmesinde FIAF'ın bir aracı olduğunu düşündürmektedir [208].

AMPK teoremi

Fosforile edilmiş AMP-aktif protein kinaz, hücrel enerji durumunu kontrol eden ve asetil-CoA karboksilaz ve karnitin-palmitoiltransferaz I dahil mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunun anahtar enzimlerini aktive eden bir enzimdir. Germ-free farelerin karaciğer ve kasında AMPK seviyeleri artmıştır. Bu enzim aktivasyonu, artan enerji harcamasının göstergesidir. Dolayısıyla germ-free farelerde diyetle bağılı obeziteden korunma mekanizmalarından birisi AMPK seviyelerinin artmasıdır. Mikrobiyotanın iskelet kası ve karaciğer AMPK'sına sinyal verdiği kesin yol FIAF'tan bağımsız görünmekle birlikte belirsizliğini korumaktadır [208].

Etanol

Bakteriyel fermentasyon (temelde Ruminococcus) tarafından üretilen endojen etanol, NAYKH'de oksidatif stresi uyarır ve karaciğer iltihabını şiddetlendirir [209]. Yapılan bir çalışma da NAYKH'lı çocukların, daha fazla Prevotella ve Gammaproteobacteria bolluğu ile ilişkili olan, önemli ölçüde daha yüksek serum etanol seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir [210]. Başka bir çalışmada ise NAYKH hastalarında artan kan etanol düzeylerinin, endojen etanol sentezindeki bir artıştan ziyade karaciğerdeki etanol dehidrojenaz aktivitesinin insüline bağılı bozukluklardan kaynaklanabileceğini göstermiştir [211].

Safra asitleri

Safra asitleri doğrudan bağırsak mikrobiyotası tarafından üretilmemektedir, esas olarak karaciğerde substrat olarak kolesterol kullanılarak sentezlenirler. Safra asitleri, bağırsak mikrobiyotası tarafından dehidroksile ve dekonjuge edilebilir ve portal ven yoluyla yeniden emilen ve karaciğere geri dönen safra asitlerinin enterohepatik dolaşımı, NASH patogenezi ve tedavisi ile bağlantılıdır ve glukoz ve lipid metabolizmasında yer alan birçok biyolojik işlevi yerine getirir [212]. NASH hastalarında safra asitlerinin serum düzeylerinin yükseldiği görülmüştür ve bu NAYKH'nın patogenezinde rol oynayabilmektedir [213]. Yapılan bir klinik çalışmada artan safra asitlerinin daha yüksek derecelerde portal (taurolitokolat) ve lobüler inflamasyon (glikokolat), hepatik steatoz (taurokolat) ve hepatosit balonlaşması (taurokolat) ile anlamlı şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir [214].

Kısa zincirli yağ asitleri

Giderek daha fazla çalışılan bir bağırsak metaboliti olan KZYA'nın ana kaynağı, diyet posalarının *Roseburia*, *Salmonella*, *Eubacterium*, *Coproccoccus*, *Marvinbryantia*, *Ruminococcus*, *Blautia*, *Anaerostipes*, *Faecalibacterium* ve *Megasphaera* dahil olmak üzere bağırsak bakterileri tarafından fermentasyonudur. Kolon lümeninde en fazla bulunan KZYA'leri propiyonat, asetat ve butirattır [215]. KZYA'leri emildikten ve portal ven yoluyla karaciğere iletdikten sonra NAYKH'nın patogenezinde rol oynarlar. Yapılan bir klinik çalışma propiyonat takviyesinin insülin duyarlılığı durumunda bozulmayı önlediğini, vücut ağırlığını ve intrahepatoselüler lipid içeriğini önemli ölçüde azalttığını ve enerji metabolizması ile yakından ilişkili GLP-1 ve peptit-YY salınımını önemli ölçüde uyardığını göstermiştir [216]. Başka bir çalışmada, zayıf bireylere kıyasla obez bireylerde toplam KZYA miktarının daha yüksek olduğu ve Firmicutes'in Bacteriodes'e oranının obez bireylerde Bacteriodes lehine değiştirdiği gösterilmiştir [217]. Bazı çalışmalarda, bütirat üreten probiyotiklerin, kısmen KZYA'lerinin aracılık ettiği farelerde yüksek yağlı diyetle indüklenen enterohepatik immünolojik uyumsuzluğu ve zayıflatılmış steatohepatiti düzelttiği gösterilmiştir [218, 219].

KZYA'leri histon deasetilazı doğrudan inhibe edebilir ve genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu düzenleyebilir. KZYA'leri arasında bütirat en güçlü histon deasetilaz inhibitörüdür [220]. Yapılan bir çalışmada sodyum bütirat takviyesinin yüksek yağlı

diyetin neden olduğu NASH'ı azaltma mekanizmasının altta yatan mekanizmasına bakılmıştır. Gastrointestinal bariyeri iyileştirdiği, bağırsak mikrobiyotasının disbiyozunu düzelttiği böylece bağırsaktan türetilen endotoksinin karaciğere verilmesini inhibe etmekle ilişkili bulunmuştur [221]. Başka bir çalışmada ise bütiratın bir GLP-1 sensitizörü olabileceği ve hepatik GLP-1R ekspresyonunu teşvik ederek NAYKH'nin NASH'a ilerlemesini önleyebileceği gösterilmiştir [222]. İlâveten KZYA'lerinin G-protein bağı reseptör (G-protein-coupled receptor, GPR) 41/43'ün aktivasyonunu sağlayarak NAYKH'nin patogenezinde yer aldığı öne sürülmüştür [223].

Dallı zincirli amino asitler

Dallı zincirli amino asitler (DZAA) kolonda proteolitik fermentasyon ile üretilir. Bu fermentasyonda yer alan türler arasında *Clostridium*, *Bacteriodes*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Actinomyces* ve *Peptostreptococci* bulunur [224]. NAYKH'lı hastalarından alınan kan ve idrar örneklerinde valin, lösin ve izolösin dahil DZAA'ler daha yüksek çıkmıştır [225]. Artan DZAA seviyeleri ve aşağı akışlı metabolitleri (dallı zincirli ketoasitler ve kısa zincirli asilkarnitinler) daha yüksek BKİ ile ilişkilendirilmiştir [226]. DZAA'lerinin bağışıklık fonksiyonunu iyileştirme, bağırsakta faydalı bakterilerin büyümesini teşvik etme, patojenlere karşı duyarlılığı azaltma ve bağırsak fonksiyonunu güçlendirme yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur [227].

2.2.8. Tedavi yöntemleri

NAYKH'nin heterojenik doğası göz önüne alındığında anti-inflamatuar, anti-fibrotik veya metabolik hastalık yolları eş zamanlı olarak hedeflenmeli, sinerjistik veya ilave bir etki uygulanması sağlanmalıdır [228].

Yaşam tarzı değişiklikleri

Enerji alımı ve enerji harcamasının eşzamanlı modülasyonu, kapsamlı bir NAYKH'nda tıbbi beslenme tedavisinin bir parçası olarak kullanılabilir. Lipotoksik yağ asitleri, polifenoller ve amino asitler gibi biyoaktif besinler açısından zengin diyetler tüketmenin yanı sıra fiziksel aktivite uygulamak, NAYKH ve ilgili parametrelerdeki gelişmelere katkıda bulunabilir. Şu anda mevcut veriler, Akdeniz diyetinin metabolik sendrom, Tip2

DM, kardiyovasküler hastalık (KVH) ve NAYKH üzerinde fayda sağlamak için sürekli olarak etkili bir diyet yaklaşımı olarak uygulanması gerektiğini desteklemektedir [229].

Tıbbi beslenme tedavisi ve vücut ağırlığı kaybı

Hastaların çoğunda metabolik sendrom veya obezite olduğu için tedavi esas olarak risk faktörlerinin azaltılması ve vücut ağırlığı kaybına yöneliktir [230]. Vücut ağırlığı kaybı temelde egzersiz ve diyet değişikliğine dayanmaktadır. %3-%5'lik bir vücut ağırlığı kaybının steatozu azalttığı, $\geq$ %5-7'lik bir kaybın NASH'ı çözdüğü ve $\geq$ %10'luk bir azalma ile hepatik fibrozun iyileşebildiği bildirilmiştir [231]. Yapılan bir çalışmada NAYKH hastalarında uygulanan diyet değişiklikleri ve egzersiz kombinasyonunun, hipoglisemik ilaçlardan (rosiglitazone) veya insülin duyarlılaştırıcılardan (metformin) daha iyi ALT seviyelerini düşürdüğünü, daha güvenli ve daha etkili bir tedavi olduğunu ortaya koymuştur [232]. Çok hızlı vücut ağırlığı kaybı durumunda steatohepatitin kötüleşmesi, karaciğer yetmezliği ve safra kesesi taşı riskini arttığı için kademeli ağırlık kaybı (>6 ay) sağlanmalıdır [233, 234]. NAYKH'nda diyet için hastanın BKİ'sine bağlı olarak 500-1000 kkal/gün kalori eksikliği ile bireysel öneriye yönelik tavsiyede bulunulmuştur [235-237]. Amerikan Kalp Derneği'nin Ulusal Kalp, Akciğer ve Kan Enstitüsü Bilimsel Bildirisi'nde metabolik sendrom için mevcut uygulama klavuzları, vücut ağırlığının başlangıça göre %7-10 azaltılmasını önermektedir [238]. Amerikan Gastroenteroloji Derneği ise BKİ >25 olduğunda başlangıç vücut ağırlığının %10'u kadar bir vücut ağırlığı kaybını hedeflemeyi tavsiye etmektedir [239]. Diyet değişiklikleri için klavuzlar, trans yağ alımının toplam kalorinin <%1'ine ve doymuş yağ alımının <%7'sine düşürülmesini, diyet kolesterol alımının <200 mg/gün'de ve toplam yağ alımının %25-35'te tutulması gerektiğini önermektedir [238].

NAYKH'nın ilerlemesi ve önlenmesi için faydalı olduğu düşünülen besinler tam tahıllı ürünler, sebzeler ve meyveler, yağlı balıklar (esas olarak ω -3'ü yüksek) ve soğuk sıkım zeytinyağıdır [240]. Soğuk sıkım zeytinyağı koruyucu bir gıdadır ve fenolik bileşikler ve tekli doymamış yağ asidi (MUFA)'lar (özellikle oleik asit) aracılığıyla sağlıklı etkilerini gösterir. Kan trigliseritlerini ve insülin direncini azaltıp lipojenik genlerin aşağı regülasyonunu indüklediği için sızma zeytinyağı NAYKH olan hastaların diyetine dahil edilmelidir [241]. Randomize çift kör bir klinik çalışmada, günde 20 g zeytinyağı kullanımının NAYKH hastalarında yağlı karaciğerin derecesini azalttığı gözlenmiştir

[242]. Başta sızma zeytinyağı olmak üzere yağın çoğu ayçiçek yağı, kanola yağı veya fındık yağı gibi doymamış yağ asidi kaynaklarından sağlanmalıdır [229].

Tavuk, balık, tofu, peynir ve kurubaklagiller dahil olmak üzere bitkisel veya hayvansal kaynakların bir karışımından ek protein ile diyetteki kompleks karbonhidratların daha çok tüketilmesi gerekmektedir [229]. Özellikle yüksek fruktoz içerikli karbonhidrattan zengin bir diyet NAYKH, insülin direnci ve obezite riskini artırdığından diyet değişikliği önemli yer tutmaktadır [243]. Bu tür hastalarda fruktozdan zengin yiyecek ve içeceklerden kaçınılmalı ve şeker tüketimi günlük enerji (kalori) alımının %10'unun altında tutulmalıdır [235, 244]. Özellikle gazlı içecekler, limonata, meyve suları, smoothieler ve kahve ve çayda bulunan ilave şekerden kaçınılmalıdır [229]. Çözünür posa alımı arttırılmalıdır. Toplam yağ miktarı azaltılmalı ve toplam enerji alımının %30'undan daha azını oluşturmamalıdır [245]. Doymuş yağ ve ω -6 yağ asidi yönünden zengin olan besinler diyetten çıkarılmalı ve ω -3 yağ asidi yönünden zengin besinler diyetle dahil edilmelidir [244]. Omega-3 yağ asidi açısından zengin bir diyet, yağ asidi sentezini azaltır ve yağ asidi oksidasyonunu destekler ve böylelikle lipid profilini iyileştirir. Omega-3 yağ asidinden zengin oldukları için balık ve balık yağı tüketimi teşvik edilmelidir [246].

E vitamini takviyesi NAYKH hastalarında kullanılan yaygın bir uygulamadır. E vitamininin antioksidan etkileri vardır ve tedavide kullanıldığında yağlanmada azalma ve transaminaz seviyelerinde ve karaciğer fibrozunda düzelme gözlenmiştir [247]. Diğer taraftan klinik uygulamalarda E vitamini takviyesini azaltan temel faktörler olan hemorajik inme veya belirli kanser türlerinde artış dahil olmak üzere farklı yan etkileri olabilmektedir [120].

Akdeniz diyeti ve hipertansiyonu durdurmak için diyet yaklaşımı (Dietary approach to stop hypertension, DASH) diyetinin NAYKH üzerinde faydalı etkileri olduğu gözlenmiştir. Akdeniz diyeti sızma zeytinyağı, yeşil yapraklılar, meyveler, tahıllar, kabuklu yemişler ve bakliyat/kurubaklagillerin yüksek alımını, diğer et, süt ürünleri, balık ve kırmızı şarap gibi fermente bir içeceğin orta düzeyde alımını ve yumurta ve tatlının daha az alımını içermektedir. Bu diyet karaciğer durumunu, özellikle lipid profilini ve hepatik insülin duyarlılığını iyileştirerek NAYKH için faydalı etkiler göstermiştir [248]. DASH diyeti ise taze ve minimum işlenmiş gıdaların tüketimini vurgulamaktadır. DASH diyeti sebze, meyve, kepekli tahıllar, kümes hayvanları, balık, kurubaklagiller ve sert kabuklu yemişler

ve düşük yağlı süt ürünlerinden zengindir. Doymuş ve toplam yağ asidi miktarı, ilave şeker ve sodyumdan ise fakir bir diyet türüdür. Yapılan çalışmalarda DASH diyetine uyum ile NAYKH riski arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir [249, 250].

Avrupa Karaciğer Araştırma Derneği (European Association for the Liver, EASL), Asya-Pasifik Çalışma Grubu (Asia-Pacific Working Party), Amerikan Karaciğer Hastalıkları Araştırma Derneği (American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD), Karaciğer Çalışmaları İtalyan Derneği (The Italian Association for the Liver, AISF) ve Kore Karaciğer Araştırmaları Derneği (Korean Association for the Study of the Liver, KASL) çalışma gruplarının yayınladığı rehberlerin NAYKH için önerileri Çizelge 2.8’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.8. Mevcut rehberler doğrultusunda alkolik olmayan karaciğer yağlanması için diyetel öneriler

	EASL [235]	AISF [251]	AASLD [236]	Asya-Pasifik [237]	KASL [252]
Enerji (Kalori) kısıtlaması	500-1000 kkal eksiklik; Haftada 500-1000g vücut ağırlığı kaybı ile toplamda %7-10 vücut ağırlığı kaybı	1200-1600 kkal/gün; düşük yağ yüzdesi (toplam kaloninin <%30’u); düşük karbonhidrat yüzdesi (top. kaloninin <%50’si)	500-1000 kkal enerji kısıtlaması *%3-5 vücut ağırlığı kaybı; steatozu iyileştirir *%7-10 vücut ağırlığı kaybı; fibrozisi içeren NASH’ın histopatolojik özelliklerinin çoğunu iyileştirir	500-1000 kkal enerji kısıtlaması	Vücut ağırlığının %7-10 azaltılması önerilmektedir. *400-500 kkal enerji kısıtlaması
Altın standart diyet	-Düşük ya da orta düzey yağ ve orta ya da yüksek düzey karbonhidrat alımı -Düşük karbonhidratlı ketojenik diyetler ya da yüksek düzeyde protein alımı *Fruktoz içeren yiyecek ve içeceklerden kaçınılmalı -Akdeniz diyeti	Akdeniz diyeti	Spesifik makrobesin ögesi bileşimi doğrulama gerektirir *Akdeniz diyeti faydalı görülmektedir	Çok düşük kalorili diyetler hariç hepsi	-Düşük karbonhidrat ve düşük fruktoz alımı önerilmektedir.
Alkol alımı risk eşiği	Erkek: 30g/gün Kadın: 20 g/gün	Erkek: 30g/gün Kadın: 20 g/gün	Erkek: Haftada 21 standart içecek (294 g) Kadın: Haftada 14 standart içecek (196 g)	Erkek: Haftada 2 standart içecek (140 g) Kadın: Haftada 1 standart içecek (70 g)	-

Bazı nutrasötiklerin de NAYKH üzerinde olumlu etkileri gözlenmiştir. Üzüm çekirdeği, nar, kakao, avokado, çay, kahve, yağlı balık/balık yağı, zeytinyağı, ceviz ve tohumlardan elde edilen ekstraktlar NAYKH'na karşı etkisini gözlemleyebilmek için hem *in vivo* hem *in vitro* olarak çalışılmıştır [253, 254]. Meyve, sebze, kahve ve şarap gibi gıdalarda yaygın olarak bulunan polifenollerin, SREBP-1c aşağı regülasyonu yoluyla lipogenezin inhibisyonu ve anti-inflamatuar ve antioksidan etkileri indükleyerek çeşitli mekanizmalar yoluyla intrahepatik trigliseriti azalttığı gösterilmiştir [255]. NAYKH olan hastalarda kendi başına polifenol alımı yetersizliği olmasına rağmen polifenol ailesinin kurkumin, yeşil çay kateşinleri, resveratrol ve kuersetin gibi üyeleri, karaciğer enzim düzeylerini, lipid peroksidasyonunu ve inflammatuar biyobelirteç düzeylerini azaltma potansiyeli göstermişlerdir [256-258]. Örneğin yapılan bir çalışmada 151 diyabetik olmayan premenopozal kadında, fukoksantin içeriği yüksek olan kahverengi deniz yosunları ve nar çekirdeği yağı ekstresinin etkisini değerlendirmişlerdir. NAYKH grubunda vücut ağırlığı, bel çevresi, karaciğer yağ içeriği ve plazma aminotransferaz enzimlerinde azalma gözlenmiştir [259].

Karaciğer hastalıklarında kahve tüketimine ilişkin bir sınırlama yapılmamaktadır [235]. NASH'lı hasta kohortunda yapılan bir çalışmada kahve alımının artmasının ileri fibrozis riskini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür [260]. Amerika'da 162.022 katılımcı ile gerçekleştirilen bir çalışmada günde 2-3 fincan kahve içenlerin içmeyenlere göre HCC riskinde %38'lik bir azalma gözlenmiştir. Günde ≥ 4 fincan kahve içenlerde ise HCC riskinde %41'lik bir azalma görülmüştür. Ayrıca, kahve içmeyenlerle kıyaslandığında günde 2-3 fincan kahve tüketen katılımcılarda kronik karaciğer hastalığından ölüm riskinde %46, günde ≥ 4 fincan kahve tüketenlerde ise %71'lik bir azalma görülmüştür [261]. Kahve; karaciğerde yağ birikimi, oksidatif stres, inflamasyon ve inflamasyonla ilgili sitokinlerin ve proteinlerin konsantrasyonunu ve ekspresyonunu azaltarak yüksek yağlı diyetin neden olduğu karaciğer hasarının ilerlemesini geciktirmeye yardımcı olur [262].

Kahve bileşimine bakıldığında hazırlama yöntemi (filtreli, filtresiz, ekspreso) ve kavurma türündeki farklılıklar etkili olmaktadır. Filtre kahvede klorojenik asit korunur ve diterpenler olan kahweol ve kafetol uzaklaştırılmış olur. Dolayısıyla her kahve türü karaciğer hastalığında etkili olmayabilir. Kaynatılmış kahve, filtrelenmiş veya hazır kahveden daha sık GGT değerini yükseltirken, filtrelenmiş kahvenin fibroz olasılığının azalması ile ilişkisi bulunmuş ve karaciğer koruyucu olarak tanımlanmıştır [263]. Sonuç

olarak meyve, sebze, çay, kahve, fındık, tohum ve sızma zeytinyağı tüketerek çeşitli biyoaktif bileşiklerin diyetle dahil edilmesi gerekmektedir [229].

Zeevi ve diğerleri [264] 800 kişide 46.898 besine verilen tokluk glukoz yanıtlarını ölçmüşlerdir ve aynı besine verilen tepkilerde büyük bir değişkenlik bulmuşlardır. Çeşitli özellikleri (diyet kalıpları, fiziksel aktivite, kan parametreleri, antropometrik değerler ve bağırsak mikrobiyotası) birleştiren bu verilere dayalı makine-öğrenimi algoritması geliştirmişlerdir. Bu veriler genel diyet tavsiyelerinin kullanımının sınırlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışma, beslenmenin NAYKH patofizyolojisi ve ilerlemesi üzerindeki potansiyel rolünü tahmin etmek için genetik, mikrobiyom ve omik teknolojilerin temel alındığı kişiselleştirilmiş diyetler geliştirmeyi ve hastalığın kontrolünün daha etkili olması için kişiselleştirilmiş beslenme müdahaleleri tasarlamayı mümkün kılmaktadır. Büyük veri analizi, teknolojiye gelişmeler ve yapay zeka ile NAYKH hastalarının özel durumuna göre bireyselleştirilmiş diyet modelleri tasarlanabilmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kişiselleştirilmiş diyet modeli [264]

Fiziksel aktivite

İnsan vücudu hareket etmeye programlanmıştır ve en çok oturanlar en az hareket etmeye eğilimlidir. Daha da kötüsü oturmak aynı zamanda sağlıksız beslenme ve daha fazla atıştırmayı da beraberinde getirmektedir. Bunlar bir araya geldiğinde “hareketsiz

davranış”, “düşük fiziksel aktivite” ve “kötü beslenme”den oluşan ‘üç vuruşlu davranışsal fenotip’ oluşturmaktadır. Ayrıca hareketsiz zamandaki artışlar, fiziksel aktiviteden bağımsız olarak NAYKH’nın gelişiminde ve buna yatkınlıkta potansiyel bir rol oynayabilmektedir [265].

Fiziksel aktivite ile geliştirilmiş periferik insülin direnci; karaciğere serbest yağ asidi sentezi için glikozun ve serbest yağ asitlerinin aşırı verilmesini azaltır. Karaciğerde egzersiz, yağ asidi sentezini azaltır, yağ asidi oksidasyonunu artırır ve DAMPs’ların salınımını azaltarak hepatoselüler ve mitokondriyal hasarı önler [266]. Vücut ağırlığı kaybından bağımsız olarak fiziksel aktivitenin artması karaciğer yağını azaltarak NAYKH üzerinde terapötik etkilere sahiptir. Önerilen eşiğin altındaki minimum fiziksel aktivite bile NAYKH üzerinde faydalı bir etki oluşturmaktadır. Direnç antrenmanı ve aerobik aktivite benzer etkilere sahiptir [267]. Metabolik sendrom tedavisi için ise haftada 5 günden fazla en az 30 dakika düzenli orta yoğunlukta fiziksel aktivite yapılması önerilmektedir [238, 268, 269]. Fiziksel aktivite için bazı kuruluşlar tarafından tavsiyelerde bulunulsa da NAYKH için optimal dozu ve yoğunluğu için evrensel bir öneri oluşturulmamıştır (Çizelge 2.9). Fiziksel aktivite, hastanın kondisyon kapasitesine, komorbiditelerine ve klinik özelliklerine göre uyarlanmalıdır [267].

Çizelge 2.9. Rehberler doğrultusunda alkolik olmayan karaciğer yağlanması için fiziksel aktivite önerileri

EASL [235]	AISF [251]	AASLD [236]	Asya-Pasifik [237]	KASL [252]
*3-5 gün toplam 150-200 dk / hafta orta yoğunlukta aerobik fiziksel aktivite (örneğin; tempolu yürüyüş) *Direnç eğitimi de etkilidir *Fiziksel aktivite doz-yanıt ilişkisinden dolayı şiddetli egzersiz fibrozis ve NASH için tam fayda sağlar.	*Aerobik ve direnç egzersizi	*Aerobik ve direnç egzersizi (>150 dakika / hafta) *Orta yoğunlukta egzersiz hepatik steatoz için iyidir, ancak karaciğer histolojisinin diğer yönleri üzerindeki etkileri bilinmemektedir. *Egzersizin optimal yoğunluğu ve süresi belirsizdir.	Aerobik ve direnç egzersizi	Haftada 2 kez en az 30 dk egzersiz hepatik steatozun azaltılmasında fayda sağlar.

Farmakolojik tedavi

NASH karaciğer histolojisi ve/veya fibrozis üzerinde birkaç ilacın etki gösterdiği bulunmuştur. Bunlar arasında Thiazolidinedione's ve Metformin gibi insülin duyarlılaştırıcılar; Statinler ve Ezetimibe gibi lipid düşürücü ajanlar; UDCA gibi hepatoprotektif ajanlar; Vitamin E gibi antioksidanlar; glukagon benzeri peptit 1 agonistleri (liraglutide) ve Dipeptidil-peptidaz IV gibi inkretin analoglar; Pentoxifylline gibi anti-inflamatuar ajanlar kullanılabilmektedir. Bunun dışında anjiyotensin reseptör blokerleri ve endokannabinoid antagonistleri de kullanılabilmektedir. Ayrıca kaspaz inhibitörleri, apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibitörü (ASK1) inhibitörleri (selonsertib), p38 mitojenle aktive olan protein kinaz (mitogen-activated protein kinase, MAPK) inhibitörleri, PPAR- α ve delta agonistleri (elafibranor / pioglitazone), FXR agonistleri (obetikolik asit), NADPH oksidaz-1/4 inhibitörleri, Galectin-3 antagonistleri, asetil CoA karboksilaz inhibitörleri, Fibroblast growth faktör (FGF)-21 ve FGF-19 analogları, CCR2 ve CCR5 inhibitörleri (cenicriviroc), Stearoyl coenzyme A desaturase-1 (SCD-1) inhibitörleri (aramchol), Lysyl oksidaz-like 2 inhibitörleri (sintuzumab) ve sirtuinlerde kullanılabilmektedir [228, 270].

Vücut ağırlığı kontrolü için Orlistat ve Sibutramin gibi ilaçlarda kullanılmaktadır. Sibutramin, iştahı bastıran bir serotonin geri alım agonistidir. Orlistat ise bağırsakta ve karaciğerde yağ emilimini engelleyerek vücut ağırlığı kaybına neden olan bir pankreatik lipaz inhibitördür. Her iki ajanından da hepatik steatoz ve serum transaminaz düzeylerini azalttığı gösterilmiştir [271, 272]. Ancak sibutramin, ciddi kardiyovasküler riskleri teşkil edebildiği belirlendiği için orlistat şu anda Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration, FDA)'nin onayladığı ve Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da obezite için kullanılan tek uzun vadeli ilaç tedavisidir. Ayrıca kısa dönem (≤ 3 ay) obezite tedavisi için FDA fentermin ve dietilpropion gibi ilaçlara da onay vermiştir [273]. Bu bilgilerin yanı sıra biyobelirteçlerin doğrulanması için belirli yollar ile ilgili fikir birliğine varılamadığı için NASH tedavisinde FDA onaylı bir ilaç bulunmamaktadır [274].

Bariatrik cerrahi

Ulusal Sağlık Enstitüleri (National Institutes of Health, NIH) Konsensus Geliştirme Konferansı'na (1991) göre, gastrointestinal cerrahi endikasyonları; BKİ'nin >40 olması

veya obstrüktif uyku apnesi, tip 2 diyabet, kardiyomiyopati ve hipertansiyon gibi ciddi kardiyopulmoner komplikasyonlarla birlikte BKİ'nin >35 olmasıdır. Bu hastalar aynı zamanda çok sayıda başarısız vücut ağırlığı kaybı girişimi öyküsüne sahip olmalı, kabul edilebilir cerrahi bir risk olmalı ve hastaların 18-60 yaş aralığında olmaları gerekmektedir [275]. Bariatrik cerrahiden önce karaciğer hacmini azaltmak için hipokalorik bir diyet uygulanmaktadır [276].

Yaşam tarzı değişikliği ve egzersiz ile vücut ağırlığı kaybının NAYKH olan bireylerde karaciğer histolojisini iyileştirdiği ve insülin duyarlılığını artırdığı bulunmuştur. Bariatrik cerrahi, morbid obezitesi olan hastalarda steatohepatit ve hepatik steatozun iyileştirilmesinde sıklıkla etkili bulunmuştur, ancak hepatik fibrozisin iyileştirilmesinde bu etkiler değişiklik göstermektedir [277]. Diğer taraftan bariatrik cerrahide hızlı vücut ağırlığı kaybı olduğu için özellikle sirotik hastalarda karaciğer yetmezliği gelişme riskini artırmaktadır. Bariatrik cerrahi genellikle morbid obez olan ve sirotik olmayan NAYKH hastalarında yapılır. Ancak bu tür hastalarda postoperatif karaciğer yetmezliği riski olduğu için birincil tedavi yöntemi olarak düşünülmemelidir [278, 279].

2.3. Alkolik Olmayan Karaciğer Yağlanması İyileştirmede Bağırsak Modülasyonu Yöntemi: Probiyotikler

2.3.1. Probiyotiklerin tanımı ve türleri

Probiyotikler, Uluslararası Probiyotikler ve Prebiyotikler Bilimsel Derneği (International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics, ISAPP) tarafından “yeterli miktarda uygulandıklarında konakçıya sağlık açısından fayda sağlayan canlı mikroorganizmalardır” şeklinde tanımlanmaktadır. Probiyotikler suş, cins ve türlerine göre isimlendirilmektedirler [280]. En yaygın türleri: *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* ve *Bifidobacterium bifidum*'dur [281]. *Lactobacilli*, *Bifidobacterium*, *Lactococci* ve bazı mayalar “genellikle güvenli olarak kabul edilen (Generally regarded as safe, GRAS)” olarak kabul edilmektedir. *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococci* ve diğer spor oluşturan bakteriler ise probiyotik olarak kullanılan ancak güvenli kabul edilmeyen organizma

gruplarıdır [282]. Özellikle *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* bakteri suşları NAYKH'na karşı umut verici bir beslenme tedavisi olarak ortaya çıkmaktadır [283-285].

2.3.2. Probiyotiklerin etki mekanizması ve bağırsak mikrobiyotası ve alkolik olmayan karaciğer yağlanması ile ilişkisi

ISAPP'ın bildirdiğine göre probiyotikler; patojen bakterilerin hayatta kalmasına ve büyümesine karşı mücadele etmekte; mukozal immün sistem veya mukozal bariyer fonksiyonlarının gelişmesini sağlamakta; karsinojenlerin ve hormonların metabolizmasında ve organ fonksiyonlarında olumlu etkileri bulunmakta; KZYA ile pantotenik asit, K vitamini, biotin ve B₆ vitamini sentezinde yararlı rol oynamaktadırlar [286].

Probiyotik bakteriler; bakteriyosinler, amino asitler ve peptitler, vitaminler, immün modüle edici ve anti-inflamatuar ajanlar, metabolik enzimler, KZYA, antioksidanlar ve eksopolisakkaritler gibi biyoaktif bileşikler üretir [287]. Probiyotik bakteriler, oral bir şekilde uygulandıktan sonra lamina propria veya intestinal epithelial hücreler ile TLR'ler yoluyla etkileşime girer ve farklı kemokin ve sitokinlerin üretimini indükler. Probiyotikler IL-10'u serbest bırakan T hücrelerini etkinleştirir. Ayrıca sıkı bağlantı proteinlerinin, müsinlerin ve Paneth ve Goblet hücrelerinin artmasıyla bağırsak bariyerini güçlendirir [288]. Probiyotikler metal iyonunu şelatlar, antioksidan metabolitler üretir (folat, glutatyon) ve konağın antioksidan aktivitesini [Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz] ve antioksidan metabolitlerini artırır. Ayrıca reaktif oksijen türleri (ROS) üreten enzimlerin aktivitelerini azaltır ve bağırsak mikrobiyotasını düzenler [289].

NAYKH olan obez çocuklarda LGG ile takviye yapıldığında karaciğer fonksiyonlarında önemli bir iyileşme gözlenmiştir [290]. NAYKH olan obez çocuklara *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium Bifidum*, *Lactobacillus rhamnosus* takviyesi yapılan başka bir çalışmada da lipid profilinde iyileşme gözlenmiştir [291]. *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* ve *Lactococcus*'u içeren 14 probiyotik bakteri cinsinin konsantre biyokütlesini içeren multi probiyotik "Symbiter" NAYKH hastalarında kullanılmıştır. Karaciğer yağı, TNF- α , IL-6 ve aminotransferaz seviyelerinde azalma gözlenmiştir [292]. NAYKH ve Tip 2 diyabet'i bulunan hastalara ω -3 ve probiyotik takviyesi yapıldığında ise serum gamma-glutamil transpeptidaz, toplam kolesterol ve trigliseritlerde azalma gözlenmiştir [293].

2.3.3. Alkolik olmayan karaciğer yağlanmasında probiyotiklerin güvenilirliliği

Probiyotikler nispeten güvenli bir profile sahiptir ve tarihsel olarak önemli bir güvenlik endişesi olmadan süt ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO)'nın 2002'de yayınladıkları rapora göre [294]; “Probiyotikler teorik olarak 4 tip yan etkidenden sorumlu olabilmektedirler:

1. Sistemik enfeksiyonlar
2. Zararlı metabolik faaliyetler
3. Duyarlı bireylerde aşırı bağışıklık uyarımı
4. Gen transferi

Sağlık Hizmetleri Araştırma ve Kalite Ajansı (Agency for Healthcare Research and Quality, AHRQ), 2011 yılında probiyotik güvenliği ve advers olay raporlarıyla ilgili literatürü kapsamlı bir şekilde gözden geçiren bir rapor yayınlamıştır. Altı probiyotik cinsi (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* ve *Saccharomyces*) ve 622 çalışmayı içermekte olan bu rapor mevcut probiyotik randomize kontrollü denemelerin, riskleri arttırmadığı sonucuna varmıştır. Ancak, probiyotik müdahale çalışmalarında advers olayların değerlendirilmesi ve sistematik olarak raporlanmaması nedeniyle, AHRQ, probiyotik müdahalelerin güvenliğini açıklığa kavuşturacak donanım henüz sahip değildir [295].

Özellikle geçirgen bağırsak hastalığı durumu olanlar, organ nakli sonrası, maligniteler ve diabetes mellitus gibi bazı klinik durumlar ve neonatal bireyler probiyotiklerin faydalı etkilerinden muhtemelen yararlanamazlar. Bu gruplarda uygulanacak bazı probiyotik suşlar zayıf bağışıklık dolayısıyla koşulları daha da kötüleştirebilir ve sepsis, endokardit ve pnömoniye neden olan patojenlere dönüşebilir [296]. Klinik çalışmalarda NAYKH olan hastalarda nadiren yan etkiler veya güvenlik sorunları bildirilmiş olsa da, klinik çalışmalarda uzun süreli, müdahale sonrası takibin olmaması güvenlik değerlendirmesi açısından bir gerilemedir. Probiyotiklerin sistemik enfeksiyonlar (bakteriyemi ve endokardit), bağırsak iskemisi, inflamatuvar reaksiyon, D-laktik asidoz ve gastrointestinal yan etkiler gibi yan etkileri olan birkaç vaka raporu bulunmaktadır [297]. Mikrobiyal

tedavi güvenli gibi görünse de, probiyotik veya sinbiyotik ilişkili yan etkileri değerlendirmek ve uzun süreli kullanım için güvenlik profillerini araştırmak gereklidir.

2.4. Karaciğer Hastalıklarını İyileştirmede Diğer Bağırsak Modülasyonu Yöntemleri

Bağırsak modülasyonu için probiyotik dışında prebiyotik, sinbiyotik, antibiyotik ve adsorbent uygulamaları, safra asidi regülasyonu ve fekal mikrobiota tranplantasyonu gibi yöntemler üzerinde de çalışmalar yapılmıştır.

2.4.1. Prebiyotikler

Prebiyotikler, seçici olarak sindirilebilen ve fermentasyondan sonra kolondaki probiyotiklerin aktivitesini ve / veya büyümesini uyararak ve konakçıya fayda sağlayan gıda bileşenidir [298]. Prebiyotik diyet lif kaynakları; beta-glukan, inülin, oligofruktoz, fruktooligosakkaritler (FOS), GOS, isomaltooligosakkaritler, guar gam, laktuloz, dirençli nişastalar ve maltodekstrin, ksilooligosakkaritler ve arabinoooligosakkaritler'dir [299].

Bir bileşiğin prebiyotik olarak sınıflandırılması için sağlaması gereken kriterler;

- 1- Bağırsak bakterilerinin aktivitesi ve / veya büyümesi bu bileşik ile seçici bir şekilde uyarılabilir ve bu konakçının sağlığına faydalı olmalı
- 2- Bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilebilir
- 3- Memeli enzimleri tarafından hidrolize edilmemelidir, midenin asidik pH'sına dirençli olmalı ve gastrointestinal sistemde absorbe edilmemelidir [300].

Prebiyotik diyet lifleri; *Lactobacilli* ve *Bifidobacteria*'da ve kalsiyum emiliminde artış ve protein fermentasyonu, alerji riski ve patojenik bakteri popülasyonunda azalma sağlar. Faydalı metabolitler üretir, immün savunmayı geliştirir ve bağırsak bariyer geçirgenliği üzerinde etkilidir [299]. Prebiyotik tüketimi gastrointestinal mikrobiyotayı modüle edebilir ancak bireysel tepkiler farklıdır. Bu fenotipik tepkiler ilgili diyet polisakkaritinin dozajı, bireyin mikrobiyota kompozisyonu, tüm diyetteki lif alımı ve konakçı genetiğine bağlıdır [301].

Prebiyotikler bağırsakta fermente olduktan sonra portal ven kanında (propiyonat ve asetat 2 katına çıkar) ve çekumda KZYA artar. Asetat lipojenik substrat olarak görev yaparken

propiyonat hepatik lipojenezin azaltılmasına yardımcı olur. Prebiyotikler, lipojenik enzimler olan yağ asidi sentaz, ATP sitrat liyaz, koenzim A karboksilaz, malik enzim ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz'ın inhibisyonu yoluyla trigliseridi düşürmektedir [6]. Yapılan bir çalışmaya bakıldığında NASH'lı bireylere prebiyotik olarak oligofruktoz uygulandığında *Bifidobacterium*'da artış ve karaciğer steatozunda iyileşme gözlenmiştir [302]. Obezite ile ilişkili NAYKH oluşturulan hayvan modelinde ise kuersetin uygulandığında insülin direnci ve intrahepatik lipid birikiminde azalma gözlenmiştir [2].

2.4.2. Sinbiyotikler

Sinbiyotikler, probiyotik ve prebiyotiklerin kombinasyonudur [303, 304]. ISAPP 2019'da yapılan panel sonrasında sinbiyotiklerin tanımını “konakçıya sağlık yararı sağlayan konakçı mikroorganizmalar ve substrat(lar)dan oluşan bir karışım” olarak güncellemiştir [305]. Sinbiyotikler bakterilerin hem gastrointestinal sistemin üst kısmından geçerken dayanıklılığını hem de kalın bağırsakta etkinliğini arttırmak için sinerjik bir etki oluşturur [303]. Sinbiyotik olarak kullanılan probiyotikler genellikle *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinslerine ait suşlardır. Prebiyotikler ise genellikle GOS, FOS, inulin, ksilooligosakkarit, laktuloz, laktosükroz, laktitol ve transgalaktooligosakkaritler'dir [306].

Sinbiyotiklerin dislipidemi, obezite, insülin direnci, oksidatif stres ve inflamasyon üzerine faydalı etkileri vardır [304]. Probiyotik, prebiyotik ve sinbiyotikler makro besin öğelerinin emilimini geciktirerek, safra asitlerinin metabolizmasıyla ve gelişmiş bariyer fonksiyonu ile toksik öğelerin emilimini azaltarak (LPS, trimetilamin vb.) ve KZYA'nın üretimi ile NAYKH'nın iyileştirilmesinde rol oynayabilmektedir [307]. İnsanlar tarafından sinbiyotik tüketiminin sağladığı faydalar:

- 1) Cerrahi hastalarda hastane enfeksiyonlarını azaltması ve bakteriyel translokasyonu engellemesi,
- 2) İmmunomodülasyon gücünü geliştirmesi,
- 3) Siroz hastalarında karaciğer fonksiyonlarını iyileştirmesi

4) Gut mikrobiyotasını dengelemesi ve *Bifidobacteria* ve *Lactobacilli* seviyesini arttırması, vb. [308].

Yapılan çalışmalarda uygulanan sinbiyotik tedavisinin etkinliği değerlendirilmiştir. NASH'lı bireylere *Lactobacillus reuteri* ve guar gum ve inülin uygulandığında BKİ, bel çevresi ve steatozu azalttığı ve vücut ağırlığı kaybı sağladığı bulunmuştur [309]. Yüksek yağlı beslenen farelere üzüm çekirdeği tozu ve laktik asit bakterileri olan *Leuconostoc mesenteroides* ve *Lactobacillus kefir* DH5 uygulandığında çekum propiyonatu ve bağırsak geçirgenliğini değiştirdiği bulunmuştur [15]. NAYKH'nda sinbiyotik tedavisi uygulandığında ise karaciğer enzimleri, serum MDA ve TNF- α seviyelerinde azalma ve hepatik steatozda iyileşme gözlenmiştir [310, 311].

2.4.3. Antibiyotikler

Antibiyotikler, klinik uygulamalarda patojenlerin aktivitesini engellemek için enfeksiyonların profilaksisi ve tedavisinde kullanılmaktadır. Bağırsak bariyerini etkili bir şekilde geçerek terapötik serum konsantrasyonlarına ulaşmaktadır [312, 313].

Rifaximin, bakteriyel translokasyonu azaltarak ve bağırsak mikrobiyota fonksiyonunu ve kompozisyonunu modüle ederek inflamasyonu düşüren, emilemeyen bir antibiyotiktir. Sirozlu hastalarda hemodinamiği iyileştirir ve endotoksemiye azaltır. Dolaşımdaki ilaç miktarı düşük olduğu için ilerlemiş karaciğer hastalıklarında daha güvenli bir seçenektir [314]. NASH'lı bireylere rifaximin uygulandığında ise serum endotoksinleri azalttığı, proinflamatuvar sitokinler, insülin direnci, NAYKH-karaciğer skoru ve sitokeratin-18'i iyileştirdiği bulunmuştur [315]. Statinler, portal hipertansiyonu azaltır ve intrahepatik dolaşım üzerinde yararlı etkileri vardır [316]. Vancomycin, Gram-positive beta-lactam-resistant bacteria ve methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* tedavisinde kullanılan ve dozu ilacın plazma oluşu seviyesi ve vücut ağırlığına göre ayarlanan bir ajandır [317]. Amoksisilin ise sınırlı miktarda gram-negatif ve yaygın oranda gram-pozitif organizmalara karşı kullanılan yaygın antibakteriyel spektruma sahip antibiyotik ajandır [318].

Antibiyotik tedavisi ile antimikrobiyal peptitlerin (AMP) ekspresyonu ve mukus tabakası kalınlığı azalır, bağırsaktaki kommensal topluluklar tükenir ve enfeksiyonlara yatkınlık artar [312]. Böylelikle mikrobiyal çeşitlilik azalması ve yararlı mikroorganizmalarda kayıp

gözlenmesi sonucu disbiyoz gözlenir [319]. Kısa süreler için bile olsa ve özellikle bebeklik döneminde antibiyotiğe maruz kalındığında, mikrobiyota üzerinde uzun süreli etkilere sebep olduğu ve bireyleri farklı hastalıklara yatkın hale getirdiği unutulmamalıdır [312].

2.4.4. Safra asidi regülasyonu

Karaciğerde, kolesterolden safra asitleri üretilir ve bağırsakta mikrobiyota tarafından metabolize edilir. Safra asitleri, ince bağırsakta bulunan, doğuştan gelen bağışıklık genlerini aktive ederek bağırsak mikrobiyal bileşimini modüle edebilir. Dolayısıyla safra asitlerinin mikrobiyal modülasyonu, safra asidi reseptörleri olan FXR ve/veya G protein-coupled membrane receptor 5 (TGR5) yoluyla değişmiş sinyale yol açarak konakçı metabolizmasını etkileyebilmektedir [320].

FXR, safra asidi nükleer reseptörü olup böbreklerde, ince bağırsak mukozasında ve karaciğerde fazla miktarda üretilmektedir. FXR'nin steatoz üzerindeki etki mekanizması; VLDL ve trigliserit metabolizması ile ilişkili birkaç genin ve PPAR α 'nın FXR-bağımlı indüksiyonu ve küçük heterodimer partneri ile SREBP-1c'nin inhibisyonudur [321]. TGR5 (diğer adıyla G-protein-coupled bile receptor 1 / GPBAR1) reseptörü ise glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde ve enerji homeostazında görev alır. TGR5 ligandları antiinflamasyonda görev alır ve NF- κ B aracılığıyla hepatik inflamasyonu negatif yönde düzenler [322]. Obetikolik asit (INT-747), Px-104, Tropifexor (LJN452), Nidufexor (LMB763), Cilofexor (GS-9674), EYP001 ve MET409 NASH'da klinik çalışmalarda kullanılan nonsteroidal FXR agonistleridir. INT-767, FXR/TGR5 agonisti olup INT-777 ise TGR5 agonistidir ve bazı karaciğer hastalıkları üzerine klinik çalışmalarda kullanılmaktadır [323]. Diyetel ve metabolik obez NAYKH olan farelere obetikolik asit uygulandığında diyetel obezitede obetikolik asitin NAYKH ve glukoz toleransını geliştirdiği sonucuna varılmıştır [324]. Yüksek yağlı diyetle indüklenen NASH'lı sıçanlara TGR5 agonisti INT-767 uygulandığında lipid birikimini ve bağışıklık hücrelerinin hepatik infiltrasyonunu azalttığı, TNF- α ve NF- κ B sinyal yolunu baskıladığı, lipid ve glikoz metabolizmasını onardığı ve proinflamatuvar yanıtı azalttığı gözlenmiştir [325]. Overektomi yapılmış ve yüksek yağlı diyetle indüklenmiş NAYKH olan farelere de INT-747 ve INT-777 uygulandığında ise metabolik değişiklikleri düzelttiği, enerji harcamasını arttırdığı ve anahtar metabolik genlerin ekspresyon modellerinin değiştiği bulunmuştur [326].

2.4.5. Adsorbanlar

Antibiyotikler, bağırsak mikrobiyotasının aracılık ettiği kolonizasyon direncini değiştirdiğinden, bağırsaktaki antibiyotik aktivitesini azaltmak için kömür bazlı adsorbanlar geliştirilmiştir [327]. Adsorbanlar; bakteriyel ürünlerin ve bağırsakta üretilen toksinlerin sistemik dolaşım ve karaciğer akışını engellemek için, adsorptif bir malzemeye bağlanmasını, emilimini azaltmayı ve daha sonra dışkı ile atılmasını sağlar [313].

Adsorbanlardan olan laktuloz (emilimi sınırlı olan bir disakkarit), HE tedavisinde kullanılır ve bağırsaktaki amonyak emilimini azaltır. Kolestamin, kaşıntı tedavisinde kullanılır ve bağırsak lümeninde safra asitlerinin bağlanmasını sağlar [313]. Oral aktive edilmiş adsorbant AST-120, kronik böbrek hastalığında kullanılır, bağırsak mukozasındaki bağışıklık hücrelerini modüle eder ve aterosklerozun hızlanmasını inhibe eder [328]. Yaqrit Limited Şirketi'nin geliştirdiği Yaq-001 isimli yeni bir sentetik aktif karbon da NAYKH'nda bağırsak mikrobiyotasını tedavi etmek ve metabolitleri düzenlemek için yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır [329]. Siraz hastalarında Yaq001 kullanıldığında inflammasom aktivasyonu ve ROS üretimi ile ilgili monosit işlevini modüle ettiği bulunmuştur [330].

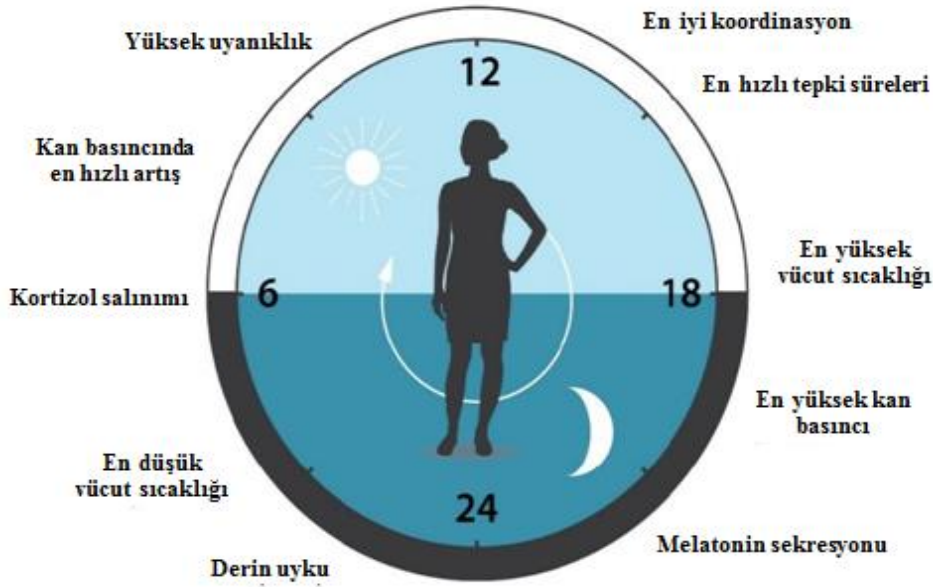
2.4.6. Fekal mikrobiyota transplantasyonu

Fekal mikrobiyota transplantasyonu, mikrobiyota işlevini ve bileşimini optimize etmeyi amaçlamaktadır. Antibiyotiğe dirençli *Clostridium difficile* enfeksiyonunun tedavisinin başarısız kalması FMT'nin temelini oluşturmaktadır. Dondurulup çözünmüş donör mikrobiyotası nazoduedonal veya nazogastrik yol, lavman veya endoskopik yolla fekal mikrobiyota verilebilir. Son zamanlarda ise kapsüllenmiş dondurulup-kurutulmuş preparatlar, öncesinde kolon temizliğine ihtiyaç duymaksızın, kapsülün oral yolla verilmesi sağlanarak yapılmaktadır [189]. FMT ile AMP salgılanması, mukus üretimi ve sağlıklı bir mikrobiyota geri yüklenebilir ve patojenlere karşı kolonizasyon direnci sağlanabilir [312]. Alkolle indüklenen karaciğer yaralanması olan farelere FMT ve prebiyotik olarak pektin uygulandığında bağırsak homeostazını onardığı, steatoz ve karaciğer iltihabını önlediği bulunmuştur [331].

Ancak FMT'nin uzun vadede takip edildiği ve oluşabilecek riskler konusunda çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Uzun vadeli riskleri tam olarak belirlenmediği ve hastalarda FMT öncesi baskılanan bağışıklık sisteminin ciddi enfeksiyonlara da yol açabileceği konusu uzmanlar tarafından endişeye neden olmaktadır. FMT sonrası karın ağrısı, gaz, şişkinlik, ishal veya kabızlık, bağırsak guruldama, bulantı/kusma ve geçici ateş gözlemlenmektedir. Perforasyon ve kanama gibi endoskopi komplikasyonları, aspirasyon, enterik patojen bulaşması, periton diyalizi uygulanan hastada peritonit, zatürre, inflamatuvar bağırsak hastalığında alevlenme, enfeksiyon ve/veya sepsis ve enfeksiyon sonrası irritabl bağırsak sendromu gibi ciddi komplikasyonlar gözlenmiştir. Ayrıca yıllar sonra tanınmayan bulaşıcı ajanların bulaşması (örneğin HIV, HCV) ve bağırsak mikrobiyotasındaki değişikliklere dayalı kronik hastalıkların (örneğin, obezite, ateroskleroz, diyabet, kolon kanseri, NAYKH, astım, otizm) indüklenmesi ise potansiyel risk etmenleri arasındadır [332]. Avrupa konsensüsü *Colostridium difficile* enfeksiyonu olan hastalarda FMT sonrası takip süresinin en az 8 hafta olması gerektiğini vurgulamaktadır [333].

2.5. Sirkadiyen Ritim

Sirkadiyen ritimler, zaman işaretlerinin (zeitgebers) yokluğunda bile devam eden ancak yine de onlar tarafından ayarlanabilen, tek bir günlük periyodu olan [circa (yaklaşık), diem (ölüm veya gün)] biyolojik döngülerdir [334]. Sirkadiyen ritimler, mantarlar, bitkiler, bakteriler ve hayvanlar dahil olmak üzere çoğu organizma tarafından sergilenen yaklaşık 24 saatlik ritmik kalıplardır [335]. Sirkadiyen saat, 24 saatlik güne dayalı olarak hücrelerin, sistemlerin, organların, gen ifadesinin ve davranışların işlevini optimize eder, düzenler ve dünyanın dönüşüne adaptasyon sağlar [336]. Sirkadiyen saatin fizyolojimizin birçok yönü üzerinde etkisi vardır. Bu saat uyku düzenini, beslenme davranışını, hormon salınımını, kan basıncını ve vücut ısını düzenlemeye yardımcı olur. Genlerimizin büyük bir kısmı sirkadiyen saat tarafından düzenlenir (Şekil 2.7.) [337].



Şekil 2.7. Sirkadiyen saatin fizyoloji üzerindeki etkisi [337]

Memeli sirkadiyen programı, hem yukarıdan aşağıya hem de aşağıdan yukarıya organizasyonu gösterir. Günlük ritimler üretme yeteneği hücrel bir niteliklidir. Bu hücrel saatler, dokularda, organlarda ve tüm organizmada sirkadiyen programı oluşturan ağlar oluşturur. Memelilerde yukarıdan aşağıya organizasyon, optik kiazmanın üzerinde bulunan bir çekirdeğe (suprakiazmatik çekirdek, SCN) dayanır. Bu kalp pili retina yoluyla fotik bilgiyi alır, kendi nöronal hücrel saatlerini senkronize eder ve "iç günü" olarak çevresel saatlerin bir ağına dönüştürür. İç günü yani bir bireyin sirkadiyen programının 24 saatlik yapısı, SCN'nin dahili zamanını ve tüm hücrel ve organ saatlerininkini entegre eder. İç gün ile dış gün arasındaki ilişki 'sürüklenme aşaması' veya 'kronotip' olarak adlandırılır. 'Kronotip' terimi ise aynı zamanda farklı aktiviteler (uyku, yiyecek alımı veya egzersiz gibi) için tercih edilen günlük zamanlarla ilişkili psikolojik bir kişilik özelliğini tanımlamak için kullanılmaktadır [338].

Merkezi bir salınım mekanizması, hem saat tarafından verilen düzenlemeyi hem de sirkadiyen günün uzunluğunu kontrol eder. Bu çıktı veya düzenleme insanlarda Neurospora'daki sporlanmadan uykuya kadar her şeyi etkileyen sayısız davranışı ayarlamaktadır. Hayvanlar ve mantarlarda bulunan saatler, iki kısımdan oluşan bir osilatöre sahiptir: 1-) pozitif bir kol, tipik olarak, ikinci bileşenin transkripsiyonunu destekleyen,

döngünün aktivatörü olarak görev yapan bir heterodimerik kompleks; 2-) negatif bir kol ise çevrildiğinde pozitif bir kolun aktivitesini inhibe etmektedir [334].

Sirkadiyen ritimler, organizmayı zeitgebers (yani zaman vericiler) olarak bilinen dışsal ipuçlarıyla senkronize etmek için çevredeki ipuçları tarafından sürüklenebilir veya ayarlanabilir. Sirkadiyen ritimlerin çevreye karışma yeteneği birkaç nedenden dolayı önemlidir: (1) çevredeki değişikliklere uyum sağlama yeteneği hayatta kalmak için kritik öneme sahiptir (örneğin, gıda bulunabilirliği ve aydınlık-karanlık döngülerindeki mevsimsel değişiklikler) ve (2) moleküler sirkadiyen saatin süresi tam olarak 24 saat değildir (insan sirkadiyen ritimleri günde ortalama 24,2 saattir) ve çevreye uyum sağlamak için sürekli olarak yeniden ayarlanması gerekir. Sirkadiyen ritimlerin çevresel ipuçlarıyla ayarlanabilme yeteneği olmasaydı, ritimler yavaş yavaş çevreden senkronize olmayacaktı ve bunun sonucunda sirkadiyen ritimlerin biyolojik işlevleri optimize etme yeteneği kayba uğrayacaktı [339].

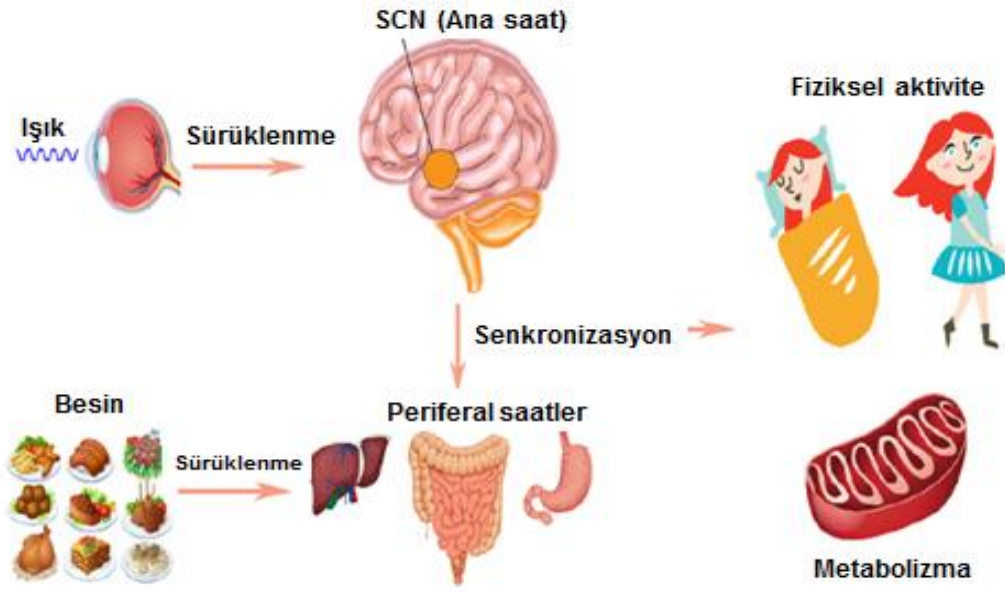
Sirkadiyen ritimler, aktivite, günlük dinlenme ve beslenme düzenine uyum sağlamak için gereken günlük fizyolojik değişiklikler ve salınımlardır ve ekspresyonları yaklaşık 12 saat arayla tepe ve dip noktalarına ulaşan ve 24 saat içinde tam bir döngüye giren çok sayıda genden kaynaklanmaktadır [340]. Memeli çekirdek sirkadiyen saati, E-box promotörüne bağlanan ve saat kontrollü genlerin transkripsiyonunu ve ardından translasyonunu başlatan "Clock" ve "Bmal1" transkripsiyon faktörlerinden oluşur [336, 341]. Clock ve Bmal1 genleri ışık fazında en bol miktarda bulunurken Cry ve Per ise karanlık fazda en yüksek düzeyde eksprese edilir [342]. İki saat kontrollü gen, Per ve Cry olup, Per ve Cry proteinlerinin birikmesi ve dimerizasyonu, geri besleme inhibisyonu ile sonuçlanır, bu sayede daha fazla Clock ve Bmal1 aracılı transkripsiyon inhibe edilir [343]. Per ve Cry'nin bozulması, geri besleme engellemesini serbest bırakır ve döngü yeniden başlar. Bu çekirdek saate ek olarak, nükleer reseptörler retinoik asitle ilgili orphan reseptör alfa (retinoic acid-related orphan receptor alpha, Ror- α), ters eritroblastoz virüs alfa (Reverse erythroblastosis virus alpha, Rev-erb α), and sirtuin 1 (Sirt1)'i içeren saatin "ince ayarı" ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası ve çeviri sonrası değişiklikleri içeren başka düzenleme mekanizmaları da vardır [344, 345].

İnflamatuvar durumlara bakıldığında da astım [346], ateroskleroz [347] ve romatoid artrit [348] gibi inflamatuvar hastalıkların gece ve sabahın erken saatlerinde alevlenmelerle

birlikte güçlü sirkadiyen bileşenlere sahip olduğu bulunmuştur. Anormal inflamasyonla ilişkili bir hastalık olan kanser ile sirkadiyen ritimler arasında da yakın bir ilişki gözlenmiştir [349]. Sağlıklı insanlarda serumda TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler, sabah sırasıyla sabah 3 ve sabah 6'da zirve yaparlar. Romatoid artrit hastalarında, her iki sitokinin zirvesi sabahın erken saatlerine doğru kayar ve bu hastaların serumlarında kontrollere kıyasla 10 kat daha yüksek IL-6 seviyesine rastlanmaktadır [350].

2.5.1. Merkezi ve çevresel sirkadiyen saatler

Moleküler sirkadiyen saat ve sirkadiyen ritimler, farklı çevresel ipuçları tarafından düzenlenen farklı moleküler saatler ile hemen hemen her memeli hücresinde bulunur [351]. Sirkadiyen sistem, ana saat ve periferik saatlerden oluşur (Şekil 2.8) [352]. SCN'de bulunan memeli merkezi sirkadiyen saatinin önemli düzenleyicileri aydınlık-karanlık döngüleridir. SCN'nin iki temel işlevi vardır; çevredeki sirkadiyen ritimleri sempatik ve parasempatik sinyaller yoluyla senkronize etmek ve optik sinirden gelen girdileri entegre etmektir [353, 354]. Daha önceleri, SCN'nin ablasyonunun çevredeki sirkadiyen ritimleri ortadan kaldıracığına inanılıyordu. Bununla birlikte, sonraki çalışmalar, SCN'nin yok edilmesinin veya inaktivasyonunun, sirkadiyen ritimlerin periferde gözlemlenmesini engellemediğini, bunun yerine sirkadiyen ritimlerin, SCN'den girdi olmaksızın yavaş yavaş birbirinden senkronize olmadığını göstermiştir [351, 355]. Bu gözlem, sirkadiyen ritimlerin içsel olduğu fikriyle tutarlıdır, ancak çevreden gelen işaretler, ritimleri dış çevre ile senkronize etmek için yardımcı olur. SCN'ye gönderilen fotik sinyaller ilk olarak Per'in sirkadiyen ekspresyonunu indükler, böylece uykuyu düzenleyen melatonin ve diğer birçok hormon salgısının sirkadiyen ritmini üretir. Doğru ayarlanmış bir ana saat, karaciğer ve ince bağırsak gibi organ ve dokularda bulunan çevresel saatleri senkronize eder [352]. Işık, merkezi sirkadiyen saatin düzenleyicisi olsa da, diğer dış işaretlerin periferik dokulardaki moleküler saatleri düzenleyebileceğini belirtmek önemlidir. Örneğin, öğün tüketim zamanı, diyet kompozisyonu ve egzersiz sirkadiyen ritim üzerinde etkilidir.



Şekil 2.8. Sirkadiyen sistemin çalışması [346].

2.5.2. Sirkadiyen ritmi etkileyen faktörler

Sirkadiyen ritmi etkileyen faktörler çok çeşitlidir ve aşağıda belirtilmiştir.

Uyku

Uyku genellikle SCN'yi gerçek karanlığa maruz bıraktığımız tek zaman olduğu için sanayileşmiş toplumlarda uykunun sirkadiyen saat üzerindeki etkisi artmıştır [356]. Uyku, beyindeki uykuyu teşvik eden ve uyarılma merkezlerini içeren, düzenlenmiş bir nörokimyasal süreçtir [357]. Uykunun zamanlaması ne kadar uyanık kaldığımıza bağlıdır (homeostaz; çoğunlukla davranışla yönlendirilir), ancak aynı zamanda güçlü sirkadiyen kontrol altındadır [338]. Uyku üzerindeki davranışsal etkiler kafein, alkol ve nikotin tüketimini kapsamaktadır [358, 359]. Davranış, ışık örnekleme (SCN yoluyla) ve beslenme (karaciğer yoluyla) şeklinde sirkadiyen saati etkilemektedir [360]. Uykunun davranış üzerindeki etkileri ise en çok uyku yoksunluğu ve performansta belirginleşmektedir [361, 362].

Uyku zamanlaması ve süresinin de sirkadiyen saat üzerinde derin etkileri vardır. Yetersiz uyku (uyku kısıtlaması), yeterli uykuya sahip bir kontrol grubuna kıyasla insan kan transkriptomundaki ritmik genlerin sayısını azaltmaktadır [363]. Ayrıca, saat ile faz dışı uyuma durumunda uyku sırasında ortaya çıkan belirli genlerin baskılanması veya artması ile kandaki ritmik transkriptlerde 6 kat azalma gözlenmektedir [364].

Işık

Neurospora'nın aynı zamanda bir model organizma olduğu ışığa tepki, belki de en iyi çalışılan ve saat girdilerinin en çok anlaşılanıdır [365]. mPer1 ve mPer2, promotörlerinde cAMP-Response Element Binding Protein (CREB) içerir ve fotik uyarılara yanıt olarak ekspresyonlarını değiştirir [366]. Günlük ışığa maruz kalma ile sirkadiyen ritmin endojen olarak üretilmesini sağlayan SCN'deki saat nöronları sıfırlanmaktadır. Bu da uyku ve uyanıklık zamanlamasını belirlemek için beyinde uyku-uyanıklık merkezlerine çoklu sinaptik projeksiyonlar göndermektedir [367]. Gece ışığa maruz kalma sonucu gözden doğrudan SCN'ye gelen girdiler yoluyla ise sirkadiyen ritim değişebilmektedir [368, 369]. Gece boyunca kısa süreli yapay ışığa maruz kalma sonucu sirkadiyen ritimlerde önemli bir kayma gözlenmekte ve sinirlilik, kaygı ve depresif davranışlara yol açmaktadır, ayrıca hayvan modellerinde öğrenme ve hafıza verimliliğini azaltmaktadır [370-372].

Melatonin

SCN tarafından üretilen bir nöral çıkış sinyalinin indüklemesi ile melatonin esas olarak epifiz bezi tarafından üretilir, üçüncü ventriküle salınır ve sirkadiyen ritmi takiben yalnızca geceleri kan dolaşımına salınır [357, 373]. Işık melatonin sentezini inhibe etmektedir. Melatonin hızla metabolize olduğu için melatonin seviyesi gece yüksek, gündüz düşüktür [357].

Melatonin, önemli bir fizyolojik uyku düzenleyicisidir. Geceleri uyku eğilimindeki keskin artış genellikle insanlarda endojen melatonin üretiminin başlamasından 2 saat sonra meydana gelir; ek olarak, gece melatonin salgılanmasının süresi, gece uzunluğu bilgisini; beyne ve SCN'nin kendisi de dahil olmak üzere çeşitli organlara iletir. İnsanlarda ve diğer günlük türlerde melatonin, sirkadiyen saatin uyanmayı teşvik eden sinyalini azaltmak için SCN'de etki eder, böylece uykuyu teşvik eder [357].

Sıcaklık

Birden fazla fizyolojik süreç ortam sıcaklığına bağlı olsa da, sirkadiyen ritim sistemi, sirkadiyen salınımların sıcaklık değişikliklerine karşı dirençli kaldığı ve ortam sıcaklığındaki değişikliklere rağmen periyodun yaklaşık 24 saat sürmesine neden olan sıcaklık kompanzasyonu adı verilen önemli bir özelliğe sahiptir [374, 375]. Ek olarak, SCN saati sıcaklık uyarılarına yanıt vermezken, SCN dışındaki hücreler ve dokular sıcaklık dalgalanmalarıyla senkronize edilebilir [376, 377]. SCN'nin sıcaklık değişikliklerine karşı dirençli olmasının nedeni, SCN hücrelerindeki sirkadiyen saatlerin sağlam bağlantılara sahip olmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir. Tetrodotoksin veya nimodipin kullanılarak SCN hücrelerinin ayrılmasından sonra, sıcaklık duyarlılığı tespit edilmiştir [376]. Sıcaklık zayıf bir senkronizatör olduğundan, hayvan deneylerinde tipik olarak bir zeitgeber olarak kullanılmamaktadır.

Simüle edilmiş vücut ısı dalgalanmalarına tepki olarak saatin faz kayması in vitro olarak gösterilmiştir [376, 378] ve sirkadiyen gen ekspresyonunun genliği, sıcaklık döngüleri ile artırılmıştır [378, 379]. Sıcaklığın saatin periyodunu etkilediği ve fazını sıfırladığı gösterilmiştir [380].

Jet-lag

Günlük programların çalışma günlerine kıyasla değiştirildiği ve merkezi ve periferik sirkadiyen ritimde aksamalara yol açtığı bir durumdur [381]. Uzun uçuşlardan kaynaklanan uyku yoksunluğu ile birlikte, birden fazla zaman diliminde hızlı seyahat nedeniyle yanlış zamanlanmış sirkadiyen ritimler, jet lag semptomlarına katkıda bulunan ana faktörlerdir [382]. Jet lag bozukluğu, gece uykusuzluk, gündüz uyku hali, depresif ruh hali ve gastrointestinal rahatsızlıklar gibi somatik semptomlarla karakterizedir. Semptomların şiddeti seyahat yönüne, bireysel faktörlere ve geçilen zaman dilimi sayısına bağlıdır. Doğuya doğru seyahat, batıya doğru seyahate göre uyum sağlamak için genellikle daha zordur. Jet lag bozukluğu genellikle kendi kendini sınırlayan ve iyi huylu bir durumdur ve semptomların 1 hafta veya birkaç gün içinde düzeldiği görülmektedir. Jet lag bozukluğunun tedavisinde ana prensip, zamanlı parlak ışığa maruz kalma ve dışarıdan melatonin alımı yoluyla sirkadiyen saatin çevreye yeniden ayarlanmasını hızlandırmaktır [383].

Vardiyalı çalışma

Vardiyalı çalışmanın sağlık üzerinde olumsuz bir etkisi bulunmaktadır. Tarihsel olarak, bu, uzun çalışma saatlerinin, gece ışığına maruz kalmanın ve psikososyal faktörlerin (vardiyalı çalışmaya toleransla ilgili olarak kabul edilen etkiler) olumsuz etkilerine atfedilmiştir [384]. Bununla birlikte, vardiyalı çalışmanın sağlıkla ilgili sonuçları öncelikle içsel biyolojik saatin sirkadiyen (yani 24 saate yakın) ritmi ile uyku/uyanıklık döngüsünün zamanlaması arasındaki temel bir yanlış hizalama açısından anlaşılmalıdır [385].

Normal uyku düzenine sahip sağlıklı, vardiyasız çalışanlarda, gündüz uyanıklığı biyolojik saat tarafından yönlendirilir, bu da gündüz uyanıklığı artıran ve gece uyanıklığı azaltan sirkadiyen ritmi üretir [386]. Bu sirkadiyen süreç, uyanık olunan saatler boyunca oluşan uyku için homeostatik bir basınçla dengelenir [387]. Gündüz saatlerinde çalışırken, bu iki süreç uyum içinde ve çevresel aydınlık/karanlık döngüsü ile senkronize olarak çalışır ve gece boyunca konsolide uykuya izin verirken uyanırken ve işte uyanıklığı korur. Geceleri veya sabah erken vardiyaları, doğal biyolojik ritmin aksine, sirkadiyen uyanıklık dürtüsü düşük olduğunda uyanık ve yüksek olduğunda uykuda olması gerektiği anlamına gelir. Bu, uykunun kısalmasına ve bozulmasına ve uyanırken aşırı uykululuğa yol açar [388]. Bu da, işyerinde artan hatalara, daha fazla kaza ve yaralanma riskine ve bozulmuş sağlık durumuna neden olur [389]. İlaveten, vardiyalı çalışma kaynaklı sirkadiyen yanlış hizalama sadece uyku ve sağlığı etkilemekle kalmaz, aynı zamanda insanların yemek yiyebileceği, egzersiz yapabileceği ve sosyalleşebileceği zamanı da belirler ve tüm bunlar fiziksel ve zihinsel sağlığı etkileyen faktörler olarak kendini gösterir [387].

Beslenme

Fiziksel aktivitede olduğu gibi sirkadiyen sistem vücudu gündüz beslenmesi için hazırlar. İnsan mide boşalması ve gastrointestinal motilite oranları sabahları zirveye ulaşır [390] ve kemirgenlerde yapılan çalışmalar safra asitlerinin ve besin taşıyıcılarının saat düzenlemesinin aktif faz sırasında sindirimi optimize ettiğini göstermiştir [391, 392]. Ayrıca, farelerin ve insanların bağırsak mikrobiyotasındaki günlük ritimler, günün zamanına özgü işlevleri yerine getirerek aktif fazda enerji metabolizmasını arttırmakta ve dinlenme fazında detoksifikasyonu desteklemektedir [342]. Glukoz ve lipidler gibi birçok besinin kan konsantrasyonlarında sirkadiyen ritimler bulunmaktadır [393].

Sirkadiyen sistem, gün boyunca uygun dokularda enerji substratı depolanmasını desteklemektedir. İnsülin duyarlılığı, aktif faz sırasında iki modlu bir günlük zirveye sahiptir [394] ve çoğu gıda için iştah durumu saat kontrollüdür ve sabahları en düşük düzeydedir, belki de azalan enerji mevcudiyetine rağmen konsolide uykuya izin vermek için bu durum mevcuttur [395]. Diyetle bağlı termojenezin de sabahları doruğa ulaşan bir sirkadiyen ritmi vardır [396].

Öğün zamanı

Beslenme, çevresel saatlerimizin harici eşzamanlayıcılarından biridir. Sirkadiyen saatin birincil rolü, organizmayı çevresel ipuçlarına sürüklemektir; bu, organizmaların gıda mevcudiyetini tahmin etmesini sağlar. Zaman kısıtlı beslenme, beslenmenin günün belirli bir saatiyle sınırlı olduğu beslenme şeklidir ve karaciğerdeki gibi periferik saatlerin SCN saatlerini değiştirmeden sürüklenmesine neden olur [397]. Besin erişimini günün belirli bir saatiyle sınırlamak, organizmaların fizyolojisi ve davranışı üzerinde derin etkilere sahiptir [398]. Damiola ve diğerleri (2000), açık düzeyde karanlık veya koyu karanlık koşullar altında geçici beslenme kısıtlamasının, periferik hücre tiplerinde sirkadiyen gen ekspresyonunun fazını 12 saate kadar değiştirebileceğini ve SCN'de siklik gen ekspresyonunun fazını etkilenmeden bırakabileceğini göstermişlerdir [397]. Dinlenme periyoduna yakın veya dinlenme periyodu sırasında (yani normal dinlenme süresinin 2 saati içinde) yemek yeme zamanı, merkezi sirkadiyen ritimleri bağırsak ve karaciğerdeki ritimlerden etkili bir şekilde ayırabilmektedir [399].

Farelerle yapılan bir çalışma sonucunda gün boyunca eşit aralıklarla verilen yiyeceklerin (günde 2, 3, 4 veya 6 öğün) periferik saat fazını etkilemediği ancak günlük eşit olmayan aralıklarla 3 öğün verildiğinde net faz değişikliklerinin olduğu bulunmuştur. Ayrıca çevresel saatlerin besin alımını azaltarak faz ilerlemesini sağladığı ve uzun bir besin alımı olmamasından sonra alınan bir besin sinyalinin çevresel saat fazını belirlemede güçlü bir faktör olduğunu bulmuşlardır [400].

Diyet kompozisyonu

Diyet kompozisyonu sirkadiyen saati etkileyen bir diğer önemli faktördür. Besin kalitesi / diyet kompozisyonu ve zamanlaması, özellikle periferik dokularda moleküler saatleri

doğrudan etkileyebilmektedir [397]. Öğün tüketim zamanı (yani besin mevcudiyetinin zamanlaması) bağırsak ve karaciğerdeki sirkadiyen saatleri güçlü bir şekilde düzenler ve bu saatler ayrıca diyet kompozisyonundan (örneğin, yüksek yağlı veya yüksek şekerli diyetler) etkilenir [401].

Yüksek yağlı diyetler bağırsaktaki sirkadiyen ritimleri bozabilir [402]. Kohsaka ve diğerleri (2007) farelerde yüksek yağlı bir diyetin lokomotor aktivite ritmi periyodunda değişikliklere ve standart sirkadiyen saat genlerinin, saat transkripsiyon faktörlerini düzenleyen nükleer reseptörlerin ve karaciğer, hipotalamus ve yağ dokusunda yakıt kullanımını içeren ilgili saat kontrollü genlerin ekspresyonu ve döngüsünde değişikliklere yol açtığını göstermişlerdir [403]. Yüksek yağlı diyet, Clock-Bmal1'in hedef genlerine kromatin alımını bozar. Aynı zamanda PPAR γ ve SREBP-1c gibi ek transkripsiyon faktörlerini hedef gen promotörlerine alır [404]. PPAR γ , Clock-Bmal1'in transkripsiyonunu doğrudan baskılayabilir, endojen saati bastırırken aynı anda bir dizi başka saat kontrollü olmayan genin transkripsiyonunu sağlayabilir [405].

Alkol tüketimi de merkezi sirkadiyen ritimleri bozabilmektedir [406]. Alkollü içecekler birçok toplumda yaygın olarak tüketilmektedir ve insanlarda ve diğer hayvanlarda özellikle moleküler, endokrin ve davranışsal sirkadiyen ritimleri bozduğu görülmektedir [13, 407].

Dünya çapında en çok kullanılan psikoaktif bileşik olan kafein, birçok besinde ve içecekte bulunur ve farelerde periferik doku saati gen ekspresyon ritimlerinin genliklerini ve fazlarını etkiler [408]. Akşam kafein tüketimi, insan sirkadiyen sistemini *in vivo* olarak geciktirir ve *in vitro* olarak saat geninin ekspresyon sürelerini uzatır [358]. Bu nedenle, kafeinin dikkatli kullanımının jetlag'ı takiben sirkadiyen ritim sürüklenmesini hızlandırabileceği belirtilmektedir [409].

Diyet polifenolleri, bazı hayvanlarda hem moleküler hem de davranışsal sirkadiyen ritimleri etkilediği tutarlı bir şekilde gösterilen başka bir bileşik grubudur [410, 411] ve diyet poliaminleri gibi diğer yeni besin takviyelerinin, kemirgenlerde sirkadiyen sistem fazını kaydırdığı bulunmuştur [412].

Yeşil çayda antioksidan özelliği sağlayan başlıca kateşin türevi EGCG'dir. Sirkadiyen saatin önemli rol oynadığı insülin direncine karşı koruyucu etkisi vardır. EGCG, bir

BMAL1 güçlendirici olarak hareket edebilir, böylece HepG2 hücrelerinde GLUT2 ve AMPK yolları gibi glikoz metabolizması ile ilgili yolları BMAL1'e bağımlı bir şekilde iyileştirir [413]. Farelerde EGCG, karaciğer ve yağ dokularında [19] ve ayrıca hipotalamusta [414] sirkadiyen ile ilişkili gen ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla diyetle bağımlı metabolik yanlışı hizalamayı iyileştirir.

Resveratrol, birçok bitkide, özellikle meyvelerde ve üzüm kabuğunda bulunan bir polifenol türüdür. Resveratrol, Sirt1 [415] ve/veya Rev-Erba'nın [416] sirkadiyen ekspresyonunu iyileştirerek diyetle bağımlı farelerde lipid metabolizmasının sirkadiyen bozulmasını/bozmasını düzeltir. Sirt1 ve Clock/Bmal1 kompleksi arasındaki etkileşimi etkilemez, ancak Sirt1 üzerindeki aktivasyon etkileri, Clock/Bmal1 aracılı transkripsiyonel aktivasyonu önemli ölçüde aşağı yönde regüle eder [417].

GLUT5 mRNA ve protein seviyelerinin ekspresyonu, sıçan bağırsak mukozasında sirkadiyen bir ritmi takip ediyor gibi görünmektedir. Daha spesifik olarak, ışık döngüsünün sonunda/karanlık döngüsünün başlangıcında, erken ışık döngüsüne kıyasla belirgin şekilde daha yüksek fruktoz absorpsiyon oranları gözlemlenir, bu da peki besleme periyoduna (21:00) karşılık gelmektedir [418, 419]. Fruktoz erişiminin sirkadiyen faz kısıtlamasının glukoz homeostazında, vücut ağırlığı artışında ve açık/karanlık kan basıncı ritimlerinde değişikliklere yol açtığı görülmüştür. Orta dereceli sirkadiyen değişikliklerin bile, fruktoz tüketiminin zamanlaması ile şiddetlenebilen metabolik sendrom semptomlarının başlamasına veya gelişmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir [420].

Besin algılama yolu

Moleküler saat ayrıca besin algılama yollarından doğrudan etkilenir. Hücrel metabolizmadaki değişiklikler, besin algılama yolları [örneğin, poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), Sirt 1, Sirtuins 7 (SIRT7), AMP, adenosine mono-phosphate, protein kinase C isoform gamma (PKC γ) ve O-GlcNAc transferase (OGT)] tarafından algılanır [421]. Bunun bir örneği, besine duyarlı AMPK tarafından saatin düzenlenmesidir. AICAR ve metformin gibi AMPK aktivatörlerinin uygulanması, fare karaciğerindeki saati sıfırlayabilir ve aktive edilmiş AMPK, CRY1'in bozulmasına aracılık etmektedir [422, 423]. Bunun bir başka örneği, NAD⁺-SIRT1-CLOCK geri besleme döngüsüdür. Clock-Bmal1, NAD⁺ kurtarma yolları için hız sınırlayıcı enzim olan Nikotinamid

fosforibosiltransferazın (NAMPT) sirkadiyen ekspresyonunu kolaylaştırır. NAD^+ ayrıca deasetilaz Sirtuin 1'i aktive eder. Bu enzim, Per2 ve Bmal1 ile doğrudan etkileşime girerek, Per2'yi destabilize ederek ve transkripsiyon/translasyon feedback döngüsünün negatif kolunun aktivitesini azaltarak saat ritimlerini etkiler [399, 424]. Besin algılama yolları, SCN olmayan doku ve organlardaki hücrel saati düzenlemektedir [421].

Fiziksel aktivite

Çevresel saati düzenlemek için kayda değer, fotik olmayan ipuçlarından birisi egzersizdir. Fiziksel aktivite veya egzersizin vücut ısı ve hormonal durum değişiklikleri gibi sempatik sinir aktivasyonu ve glukokortikoid salınımı yoluyla periferik saatleri etkilediği bilinen çeşitli fizyolojik değişikliklere neden olduğu ileri sürülmektedir [425]. Vücut sıcaklığındaki yükselme, memelilerin sirkadiyen kalp pili için bir girdi görevi görebilir [426]. Ek olarak, egzersiz melatonin üretimini ve salınımını teşvik etmektedir. Uyku-uyanıklık döngüsünün sirkadiyen bileşenlerini modüle etmek için 4 haftalık melatonin tedavisinin faydalı etkisi, genellikle daha iyi bir uyku kalitesi ile sonuçlanmaktadır [427].

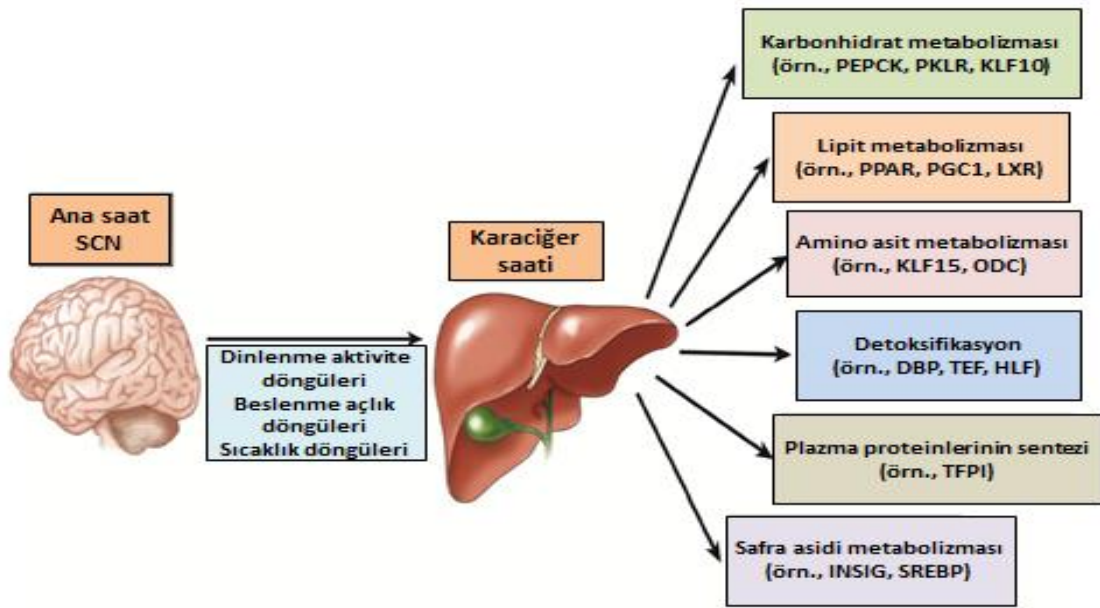
Periferik dokulardaki moleküler sirkadiyen saat, egzersiz zamanına tepki verebilir, bu da fiziksel aktivitenin vücuttaki sirkadiyen saatlerin senkronizasyonu için önemli zamanlama bilgileri sağladığını düşündürmektedir. Sirkadiyen ritmi değiştirmek için gereken egzersizin tam süresi ve yoğunluğu belirlenmemiş olsa da, farelerde yapılan bir çalışmada, 4 hafta boyunca günde 2 saat boyunca sürdürülen düşük yoğunluklu dayanıklılık egzersizinin sirkadiyen saati ve sirkadiyen ritmikliği değiştirdiği bulunmuştur [428].

Egzersiz ayrıca kas ve akciğer dokusundaki sirkadiyen ritimleri de düzenleyebilir [429]. Bu nedenle, düzenli ve öngörülebilir yeme veya egzersiz kalıpları, bir organizmanın bu faaliyetlerden kaynaklanan streslere (örneğin, oksidatif stres) en iyi şekilde uyum sağlamasını ve tepki vermesini sağlayacaktır.

2.5.3. Karaciğerin sirkadiyen saati ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı ilişkisi

Suprakiazmatik çekirdek, iç fizyolojinin dış çevre ile senkronize olmasını sağlayan endojen biyolojik ritimler üretir. Normal koşullar altında, safra asitleri, glukoz ve insülin, lipidler ve ilaç enzimlerindeki ritimler, karaciğer fizyolojisinin homeostatik kontrolüne

katkıda bulunur. Sirkadiyen bozulma koşulları altında, bu fizyolojik ritimlerdeki bozulmalar, SCN ile perifer arasında senkronize olamayan zaman ile sonuçlanır ve bu durum obezite, diyabet ve metabolik sendromun diğer semptomları ile ilişkilidir [430]. Hipotalamik ana saat, beslenme, ritmik aktivite ve sıcaklık işaretleri yoluyla karaciğer saati gibi çevresel osilatörleri senkronize eder. Karaciğer saati, anahtar hepatik metabolik çıktıların hız sınırlayıcı enzimlerini ve ana düzenleyicilerin döngüsel ifadesini yönlendirir. Karaciğer fizyolojisinin sirkadiyen düzenlemesi ve etki fizyolojisi Şekil 2.9'da belirtilmiştir [431].



Şekil 2.9. Karaciğer fizyolojisinin sirkadiyen düzenlemesi [431]

SCN, *Suprakiazmatik nükleus*; *PEPCK*, *phosphoenolpyruvate carboxykinase*; *PKLR*, *piruvat kinaz*; *KLF10*, *Kruppel-like factor 10*; *PPAR*, *peroxisome proliferator-activated receptor*; *PGC1*, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1*; *LXR*, *liver X receptor*; *KLF15*, *Kruppel-like factor 15*; *ODC*, *ornitin dekarboksilaz*; *DBP*, *TEF* ve *HLF*, *PAR-alanlı bazik lösin fermuar proteinleri*; *TFPI*, *tissue factor pathway inhibitor*; *INSIG* *insülin induced gene*; *SREBP*, *sterol regulatory element-binding protein*.

Geç uyum, uzun uyku süresi ve kısa uyku süresi gibi sirkadiyen uyumsuzluk, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı ile ilişkili bulunmuştur [432, 433]. Çekirdek saatin bozulması, lipolitik hızın düşmesine ve adipositlerde daha büyük lipid damlacığı ve hipertrofi için artan eğilime sebep olmaktadır [434]. Karaciğerdeki sirkadiyen eksen

tarafından, *de novo* lipogenez transkripsiyonel olarak düzenlenmektedir. Rev-Erb α 'nın hedeflenmesi ve onun kontrollü sirkadiyen lipogenez ritmi, kemirgen hastalığı modellerinde hepatik steatoz ve dislipidemiye düzeltmede etkili bulunmuştur [435].

2.5.4. Sirkadiyen ritim ve metabolik sendrom

Genel olarak, çevresel saatler merkezi saatten senkronize olmadığında, krono-bozulma ile sonuçlanır [436]. Bu fizyolojik değişiklik, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, depresyon, obezite ve metabolik sendrom gibi farklı hastalıklarla ilişkilidir [398].

Lipit metabolizması

Periferik dokularda, lipid biyosentezinde ve yağ asidi oksidasyonunda yer alan yüzlerce gen, saat proteinleri tarafından ritmik olarak aktive edilir ve bastırılır, dolayısıyla lipidlerin sirkadiyen regülasyonu için doğrudan bir mekanizma sağlar. Saat gen fonksiyonunun bozulması, bozulmuş lipid Emilimi ve anormal metabolik fenotipler ile sonuçlanır, bu da sirkadiyen sistemin normal enerji metabolizması için gerekli olduğunu gösterir. Besinlerin bileşimi ve zamanlaması, lipid metabolizmasının düzensizliği ile ilişkili olağan dinlenme fazı sırasında besin alımı ile metabolik yolların günlük düzenlenmesini etkiler. Metabolomik ve lipidomik platformları kullanan son çalışmalar, insan plazmasında yağ asitleri, gliserofosfolipidler, triasilgliserol, sfingolipidler ve sterol lipidler dahil ancak bunlarla sınırlı olmayan yüzlerce lipid türünün sirkadiyen sistem tarafından düzenlendiğini göstermiştir [437].

Glukoz metabolizması

Sağlıklı insanlarda glukoz toleransında günlük bir ritim olduğu kabul edilmektedir. İntravenöz glukoz infüzyonları, oral glukoz ve aynı öğünlerin tümü, akşamları sabaha göre önemli ölçüde daha yüksek plazma glukozu artışına (yani daha düşük glukoz toleransına) neden olmaktadır [438]. Fareler ve sıçanlar gibi kemirgenlerde de benzer günlük ritimler gözlemlenmiştir. Ancak, gece aktif oldukları için gündüz (dinlenme evresi) gece vaktinden (aktif evre) daha düşük glukoz toleransına sahiptirler [439]. Aşırı hepatik glukoz üretimi, azalmış insülin duyarlılığı ve azalmış β -hücre fonksiyonu dahil olmak üzere, glukoz toleransının azalmasına katkıda bulunabilecek birçok faktör vardır. Çok sayıda çalışma,

sağlıklı insanlarda hem insülin duyarlılığının hem de glukozu karşı β -hücre duyarlılığının akşam yemeğinde kahvaltıya göre daha düşük olduğunu göstermiştir [438]. Normoglisemik insanlarda glukoz homeostazının günlük düzenlenmesinde hepatik glikoz üretiminin rolü hala net değildir. Yapılan bir çalışmada hepatik glikoz üretiminde uykuyla ilişkili bir düşüş ve şafakta artmış bir hepatik glikoz üretimi gösterirken [440], başka bir çalışmada 24 saatlik açlıkta, hepatik glikoz üretiminde günlük ritim bulamamıştır [441] veya öğle ve akşam yemekleri ile kıyaslandığında kahvaltıda daha düşük bir yemek öncesi hepatik glikoz üretimi bulunmuştur [442]. Bu çalışmalarda test gününde farklı yemek programları farklı gözlemlere katkıda bulunabilir. Bununla birlikte, diyabetik hastalarda sıklıkla gözlenen şafak fenomenine (sabahları hiperglisemi) katkıda bulunan tip 2 diyabet hastalarında hepatik glikoz üretiminin net bir günlük ritmini göstermiştir [438, 441]. Sabah kahvaltısından önce yükselen sabah hepatik glikoz üretimi, uzun süreli gece açlığına ve bunun sonucunda ortaya çıkan karşı düzenleyici hormonlardaki (örneğin kortizol, büyüme hormonları, norepinefrin) artışa ve/veya kemirgen çalışmalarında önerildiği gibi hepatik glikoz üretiminin sirkadiyen modülasyonuna bağlı olabilmektedir [443]. Sirkadiyen yanlış hizalama protokolü kullanan bir araştırmada, glukoz toleransındaki günlük ritmin, davranışsal ve çevresel değişikliklerin etkilerinden ayrı olarak sirkadiyen zamanlama sistemi tarafından güçlü bir şekilde düzenlendiği gösterilmiştir [444].

İnsülin direnci

SCN, glukoz toleransını etkileyen çeşitli hormonların günlük salınım ritmini kontrol eder. İlk olarak, hipotalamik-hipofiz-adrenal eksenin aktivitesi, SCN'den paraventriküler çekirdeğe bağlantılar yoluyla düzenlenir ve aktif periyodun başlangıcından önce bir tepe noktası olan günlük bir kortizol sekresyonu ritmi ile sonuçlanır [445]. Glukokortikoid kortizol, insülin sinyalini etkiler ve insülin sekresyonunu azaltır [446]. İkinci olarak, melatoninin (aynı zamanda hem gündüz hem de gece türlerinde yalnızca karanlık fazda salındığı için karanlık hormonu olarak da bilinir) insülin salgılanmasını etkileyen sirkadiyen ritmi [447], epifiz bezine paraventriküler çekirdek ve intermediolateral kolon yoluyla SCN'den gelen çıktıyla düzenlenir [448]. Üçüncü olarak, karaciğer ve kaslarda insülin etkisini antagonize eden büyüme hormonundaki günlük ritim, uyku-uyanıklık döngüsünü kontrol ederek SCN tarafından kısmen düzenlenir [449, 450].

Uyku ritimlerinin akut bozulması insanlarda insülin duyarlılığının azalmasına yol açmaktadır [451]. Geç yeme düzeninin glikoz kontrolü üzerinde olumsuz etkiler oluşturabileceği, vücut ağırlığını artırarak dolaylı olarak insülin direncine neden olabileceği belirtilmektedir [452]. Diğer taraftan insülin duyarlılığının diyetle bağlı termojenez [396], kahverengi adipoz doku aktivitesi [453], merkezi saat uyku-uyanıklık döngüsü [454] ve dinlenme enerji harcaması [455] gibi enerji harcamasının çoklu bileşenlerinin sirkadiyen düzenlenmesinden sorumlu olduğu gözlemlenmiştir.

Tip 2 diyabetes mellitus

Yüksek diyabet insidansı vardiyalı çalışma ile ilişkili bulunmuştur [456]. Tüm vücutta veya sadece β -hücresinde çekirdek saat genlerinin (Bmal1) deneysel genetik bozulması, mitokondriyal fonksiyonda önemli bozulmaya, ayrılmaya ve sonunda insülin sekresyonunu bozan β -hücresinde aşırı oksidatif stres oluşumuna yardımcı olan veziküler taşımanın bozulmasına yol açar; böylece kademeli olarak diyabet gelişimine yol açar [457, 458]. Transkriptom analizi de sirkadiyen salınımlı birçok transkriptin insülin sekresyonunda yer alan proteinlere çevrildiğini göstermektedir [458].

Obezite

Obezite her zaman metabolik bozukluklarla bağlantılıdır. Obezitenin temel nedeni, insan vücudunda lipid metabolizması bozukluğu ve aşırı yağ birikimidir. Obezite aynı zamanda tip 2 diyabet gibi diğer birçok hastalığın komplikasyonudur. Bu hastalıklar çoğunlukla metabolizma ile ilgilidir ve lipid metabolizması bozukluğuna yol açar ve sirkadiyen bozukluk da bunlardan birisidir. Homozigot CLOCK mutasyonu [459] ve sirkadiyen besin alımının bozulması [460] farelerin vücut ağırlığını arttırmaktadır. İlginç bir şekilde, gündüz ve gece beslenme oranındaki azalma, farelerin vücut ağırlığını alımını azaltmıştır [461]. Ayrıca, zaman ayarlı yüksek yağlı bir diyet ile aynı miktarda kalori tüketirken ad libitum olarak düşük yağlı diyetle beslenen fareler kıyaslandığında vücut ağırlığında %12 azalma bulunmuştur [462]. Bu kanıta dayanarak, sirkadiyen bozulma/bozukluk obezite ile yakından ilişkilidir.

Obezite tedavisinde temel diyet tedavisi yaklaşımı kısıtlı enerji (kkal) alımıdır [463]. Genellikle diyetler planlanırken yemek saatleri ve uyku saatleri gibi biyolojik ritmi

doğrudan etkileyen faktörler rutin olarak incelenmez. Sirkadiyen saat, enerji homeostazında ve metabolik süreçlerde önemli bir role sahiptir. Bu nedenle obezite gibi metabolik hastalıkları olan bireylerde sirkadiyen ritim bozukluklarına yol açabilecek faktörlerin (vardiyalı çalışma, düzensiz uyku, uykusuzluk vb.) değerlendirilmesi, egzersiz ve yemek zamanlarının normal biyolojik ritimlere göre planlanması (örneğin, termojenezi artırmak için sabahları protein içeren gıdaların seçimi) tedavinin etkinliğini artırabilir [464].

KVH (dislipidemi, HT)

Kardiyomiyosit metabolizması sirkadiyen kontrol altındadır [465] ve sirkadiyen ve günlük ritimler sırasıyla kan basıncında, kalp hızında ve trombosit agregasyonunda ve ayrıca birden fazla KVH kategorisinin insidansında gözlemlenmektedir [466].

Epidemiyolojik kanıtlar, vardiyalı çalışmanın felç [467], koroner kalp hastalığı [468], miyokard enfarktüsü [469], ateroskleroz [470] ve hipertansiyon [471] için risk faktörü olduğunu bulmuşlardır. Alibhai ve diğerleri (2017) mutant farelerde Clock'u bozmanın yaşa bağlı kardiyomiyopatiye yol açtığını bulmuşlardır ve Clock'un metabolizma ve anjiyogeneze düzenleyici bir rol oynayan AKT sinyal yolu (protein kinaz B) aracılığıyla kalp sağlığı durumunu düzenlediğini öne sürmüşlerdir [472]. Morris ve diğerleri (2016) vardiyalı çalışma gibi sirkadiyen aksama/bozukluğun kan basıncındaki artışa aracılık ettiğini ve kan basıncındaki ilerleyici yükselmelerin kardiyovasküler hastalık riskini artırdığını belirtmişlerdir [473].

2.5.5. Sirkadiyen ritim bozuklukları, bağırsak mikrobiyotası ve beslenme ilişkisi

Mikrobiyota, besin bileşenlerinin sindirimi, konak metabolizması, bağışıklık sisteminin olgunlaşması ve işlevi ve hatta konak davranışı ve bilişsel işlevi dahil olmak üzere birçok fizyolojik sürecin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve bunların tümü sirkadiyen kontrolün özelliklerini gösterir [474]. Bağırsak epitel hücreleri tarafından ritmik mikrobiyal algılamının ise epitelyal homeostaz için gerekli olduğu bulunmuştur [475].

Bağırsak mikrobiyomu, KZYA'de dahil olmak üzere metabolitler aracılığıyla konakçı sirkadiyen ritminin kritik bir modülatörü olarak ortaya çıkmaktadır [476-478]. Bağırsak

mikrobiyotasının sirkadiyen ritimleri ve diyetin yağ bileşimi ile değişen karaciğer saati iletişim kurmaktadır [402, 479]. Bu tür haberci metabolitlerin bir sınıfı, KZYA'dır [402]. Bu mikrobiyal-konak saat sinyalinin etkisi yaygındır. Thaiss ve diğerleri (2016) mikrobiyom bileşiminin sirkadiyen ritminin, karaciğer ve bağırsak dahil olmak üzere konakçı organlardaki fizyoloji ve moleküler salınımların sirkadiyen ritimlerini belirlediğini bildirmiştir [480]. Weger ve diğerleri (2019) bağırsak mikrobiyomunun periferik saatlerde sirkadiyen salınımlarda cinsel dimorfizmi şekillendirdiğini göstermiştir. Bu mikrobiyal etki, karaciğerde ksenobiyotik reseptör aktivasyonu ile ilişkilidir [477].

Bağırsak saati, besin alımından kaynaklanan sinyallerle senkronize edilir [392]. Bağırsak saati, bağırsak hareketliliğini ve besin emilimini düzenler [481]. Bakteriyel sirkadiyen saati, ilk önce ışığa duyarlı siyanobakteriyel topluluklarda incelenmiştir [482]. Siyanobakterilerin (ışığa duyarlı bakteriler) metabolizmasına bakıldığında sirkadiyen dalgalanmalar gözlemlenmektedir [483].

Yemek yeme zamanı, çeşitli mikrobiyal fonksiyonları (besin mevcudiyetinde hücre büyümesi, enerji hasadı ve DNA onarımı baskın iken açlık periyotlarında detoksifikasyon baskındır) düzenlemektedir ve genel topluluk popülasyonunu (baskın bakteri değişimi) yönlendirmektedir. Aydınlık-karanlık döngüsü memelilerde merkezi sirkadiyen saat için zeitgeber iken yemek yeme zamanı ise bağırsak sirkadiyen ritimlerinin zeitgeberidir [342].

2.5.6. Sirkadiyen ritim tedavisi

İnsan sağlığını iyileştirmek için sirkadiyen saatlerin periyodunu, fazını veya genliğini değiştirmek için kronobiyojoloji ve farmakolojide yaklaşım geliştirme çabaları devam etmektedir [484]. Son yıllarda metabolik sağlığı sürdürmek için sirkadiyen ritme bağlı tedaviler, beslenme müdahaleleri ve egzersiz yaklaşımları geliştirilmiştir ve bu yaklaşımlar sırasıyla “kronofarmakoloji”, “krononutrisyon” ve “kronoegzersiz” olarak adlandırılmaktadır.

Kronofarmakoloji

Kronofarmakoloji, ilacın etkinliğini, emilimini ve/veya etkinliğini artırmak için ilaç dozlarının uygulanması için doğru zamanlamayı inceler [485]. Örneğin, kolesterol oranını

sınırlayan bir enzim olan β -hydroxy β -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) enzimi, insanlarda sirkadiyen bir ritim gösterir. Bu enzim geceleri zirve yapar, bu nedenle etkinliklerini en üst düzeye çıkarmak için statinler gibi kolesterol düşürücü ilaçların gece alınması önerilir [486].

Melatonin takviyesinin yaşlı erişkinlerde [487], çocuklarda [488], ergenlerde [489] ve menopoza sonrası kadınlarda [490] uykuya başlama gecikmesini, süresini ve kalitesini iyileştirmek için güvenli ve etkili bir yöntem olduğu da gösterilmiştir.

Hastaların sepsisten iyileşmesinin, gece ve gürültünün azaltılması ve yoğun bakım ünitelerinde uyku kalitesinin iyileştirilmesi gibi basit önlemlerle geliştirilebileceği vurgulanmaktadır [491]. Sirkadiyen ritim uyku bozuklukları için parlak ışık tedavisi, uyku-uyanıklık bozukluklarında etkili bir tedavi seçeneğidir. İnsan sirkadiyen sistemi ışığa karşı son derece hassastır. Parlak ışığa uygun zamanlı olarak maruz kalma, sirkadiyen sistem ile istenen uyku-uyanıklık programı arasındaki yanlış hizalamayı düzeltmek için uyku-uyanıklık döngüsünü daha sonraki veya daha erken zamanlara kaydırabilmektedir. Işığın sirkadiyen ritimleri sıfırlamadaki etkinliği, günün saati, ışığın uygulandığı doz ve spektral içerik tarafından belirlenmektedir [367].

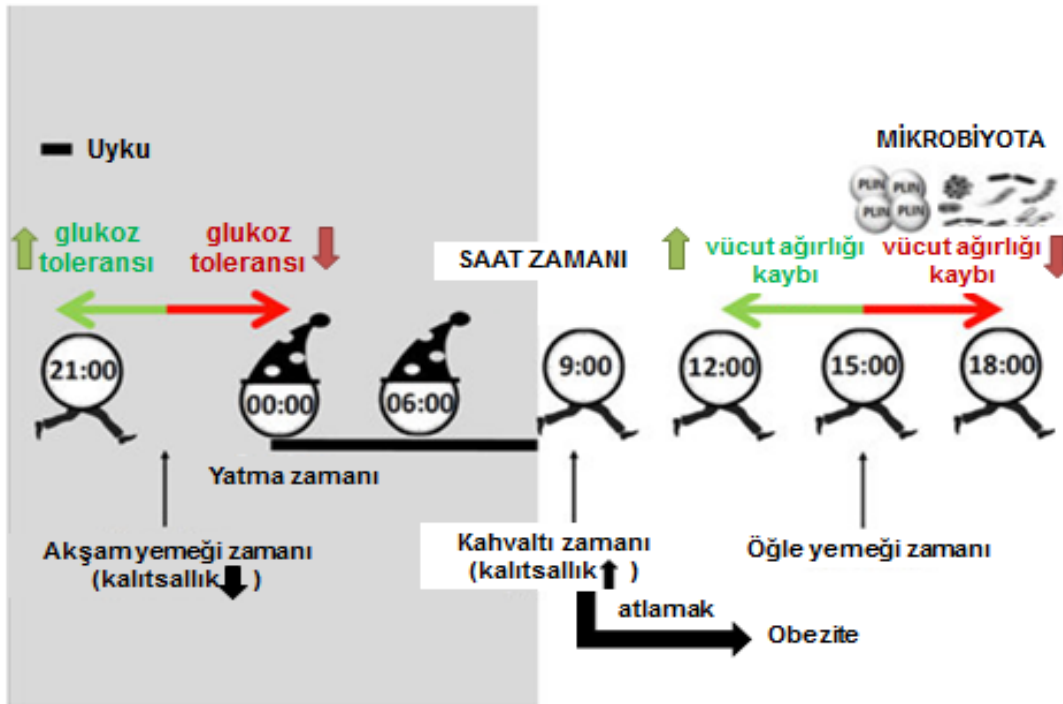
Krononutrisyon

Krononutrisyon, sirkadiyen ritmi düzenlemek ve sağlığı korumak için besinler ve yemeğin zamanlamasını içeren optimal besin alımını belirlemeye yönelik bir yaklaşımdır. Dolayısıyla krononutrisyonun 2 yönü vardır;

- 1) Besinler/besin bileşenleri saat sistemini düzenler, örneğin kafein lokomotor aktivite ritmini ve sirkadiyen saatlerin periyodunu uzatır ve yüksek yağlı diyetler dolaşımdaki lipidler, lipogenez, lokomotor aktivite ve beslenme davranışının ritimlerini değiştirir.
- 2) Öğün zamanlaması, saat sisteminin çıktısını etkiler; örneğin, gece yemek yemek ve kahvaltıyı atlamak obezite riskini artırırken, zaman kısıtlı beslenmeler, yüksek yağlı diyetlerin neden olduğu metabolik bozuklukları önler. Düzenli/zaman kısıtlı beslenmeler, saat sisteminin ritimlerini güçlendirir ve senkronize eder, oysa düzensiz/olağandışı

beslenmeler, ritimleri zayıflatır ve senkronizasyon bozukluğuna neden olur ve muhtemelen metabolik bozukluklara yol açar [492].

İnsanlarda kahvaltıyı atlama, obezite ile nedensel olarak bağlantılıdır ve geç öğle yemeği (saat 15:00'ten sonra), özellikle Perilipin'deki genetik varyantın taşıyıcılarında vücut ağırlığı kaybını engeller. Geç öğle yemeği yemenin mikrobiyota çeşitliliği ve bileşimi üzerinde zararlı bir etkisi vardır. Geç akşam yemeği ise (yatmadan önceki iki saat içinde), özellikle melatonin reseptör 2 (MT2, MTNR1B) rs10830963'teki risk alelinin G taşıyıcılarında glikoz toleransını azaltır (Şekil 2.10). Ayrıca akşam yemek yiyen (uykudan iki saat önce) akşam kronotiplerinde obez olma olasılığı beş kat artarken, sabah saatlerinde (uyanma saatinden iki saat sonra) yüksek kalori alımı olan sabah kronotiplerinde obez olma olasılığı %50 azalmaktadır [452].



Şekil 2.10. Besin alımının sirkadiyen zamanlaması [452]

Zamanlanmış öğünler, uyku ve aktivite dahil olmak üzere bir dizi yaşam tarzı değişikliği, güvenlikleri ve optimal sirkadiyen sağlığa ulaşmadaki etkinlikleri açısından araştırılmıştır [493]. Son yıllarda beslenme rejimleri konusunda bazı gelişmeler rapor edilmiştir. Örneğin, aktif faz sırasında 8-9 saat boyunca gıda erişimi ile karakterize edilen zaman

kısıtlamalı beslenmenin, metabolik bozukluklarda güçlü önleyici ve tedavi edici etkiler gösterdiği bulunmuştur [399, 494]. Ayrıca, insan yaşam tarzındaki iş günlerini ve hafta sonlarını taklit ederek, haftada sadece 5 gün zaman kısıtlı beslenme uygulandığında ve kalan 2 gün için ad libitum besleme uygulandığında faydaların korunduğu gözlenmiştir. Hareketsiz fazda yemek yemenin enerji harcamasını azalttığı ve vücut ağırlığı alımını hızlandırdığı fikriyle tutarlı olarak; toplam enerji alımı (kalori) benzer bir seviyede tutulduğunda, enerji (kalori) bakımından zengin akşam yemeği tüketen grup ile karşılaştırıldığında kahvaltı sırasında daha büyük bir enerji alımı sağlayan (kalori) katılımcıların metabolik homeostazı sağlamada güçlü bir gelişme gösterdiği bulunmuştur [495]. Anormal şekilde zamanlanmış gıda tüketiminin bir sonucu olarak ortaya çıkan enerji dengesizliği, gece uykusu yoksunluğu veya geç uykudan kaynaklanan metabolik düzensizliği açıklayabilir. Bir çalışma haftasını taklit etmek için 5 günlük uyku yoksunluğunun uygulandığı bir insan çalışmasında, katılımcıların enerji harcamasında bir artış gözlemlenmiştir, bu da daha abartılı enerji alımına yol açarak enerji depolaması ve vücut ağırlığı artışı ile sonuçlanmıştır [496].

Kronoegzersiz

Kronoegzersiz, öncelikle egzersiz uzunluğunun sağlığın ve spor performansının korunması, iç saat sistemindeki hızlı değişiklikler veya sirkadiyen saatin yeniden düzenlenmesi üzerindeki etkisini araştırır [497].

Zaman kısıtlı beslenmenin yanı sıra, laboratuvar ve klinik ortamlarda geçici olarak kontrol edilen aktivite de incelenmiştir. İnsanlarda egzersiz ve aktivitenin sirkadiyen melatonin ritimlerini sıfırlayabildiği [498] ve öğleden sonra yapılan egzersizin yaşlı insanlarda uyku kalitesini iyileştirebildiği bulunmuştur [499]. Bu nedenle, planlanmış uyku rutinlerinin sirkadiyen ritimleri de iyileştirebileceği düşünülebilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Yeri, Zamanı ve Örneklem Seçimi

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi (İNÜ-DEHÜM)'nde 18.05.2021 ve 17.08.2021 tarihleri arasında yapılmıştır.

3.2. Etik Kurul İzni

Araştırmaya, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Araştırma Merkezi tarafından alınan 17.05.2021 tarihli ve 2021/10-2 sayılı onay kararı (EK-1) ile başlanmıştır. İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilen bu çalışma boyunca deney hayvanları ile çalışma ilkelerine uyulmuştur.

3.3. Deney Hayvanlarının Seçimi

Çalışmaya 6 haftalık, sağlıklı, 27 adet Wistar albino cinsi sıçanlar alınmış ve çalışma başlangıcında ortalama ağırlıkları 150 g (95 - 177) olarak belirlenmiştir. Dişi sıçanlarda bulunan östrojen hormonu diğer parametreleri ve hormonları etkileyebileceği için erkek sıçanlar tercih edilmiştir [500-502].

Sıçanlar, farelere kıyasla yaklaşık 10 kat daha büyük vücut boyutları ve daha kararlı enerji metabolizması olması nedeniyle, insanların metabolik hastalıklarını araştırmak için farelerden daha uygun hayvan modelleri olabileceği belirtilmektedir [503]. Metabolik hastalık çalışmalarında yaygın olarak Sprague-Dawley ve Wistar türü sıçanlar kullanılmaktadır. Bu sıçanlar hipertansiyon, trigliserit seviyesi ve vücut ağırlığındaki artışı gösterebilmektedir. Ancak Sprague-Dawley türü sıçanlara göre daha yüksek metabolik hıza yol açan daha aktif davranışlar gösterdiği için çalışmamızda Wistar türü sıçanlar tercih edilmiştir [504].

Bağışıklık sistemi genç yaşta (3-4 haftalık) hala gelişmekte olduğundan, modülatör etkiler oluşabilir ve sistemik tepkiler hazırlanabilirdi. Bu yüzden çalışmamızda yetişkin yaş modeli (6 haftalık) uygulanmıştır. de Moura et al. (2009), yetişkin (90 günlük) ve genç (28

günlük) sıçanlara %60 fruktoz içeren bir diyet verildiğinde oluşan metabolik sendrom belirtilerini karşılaştırmıştır. Daha uzun müdahale süresine (8 haftaya karşı 4 hafta) ve %40 daha yüksek fruktoz alımına rağmen, genç sıçanlar yetişkin akranları kadar şiddetli metabolik sendrom belirtileri göstermemişlerdir [504]. Ayrıca, fruktoz klirensinin, istenmeyen metabolik sonuçları hafifletebilecek kronik maruziyetle arttığı gösterilmiştir [505]. Bu nedenle, bu tür kısmen beklenmeyen sonuçların gerisinde kalan ve daha fazla araştırma gerektiren yaşa bağlı bazı mekanizmalar olabileceği de her zaman göz önünde bulundurulmalıdır.

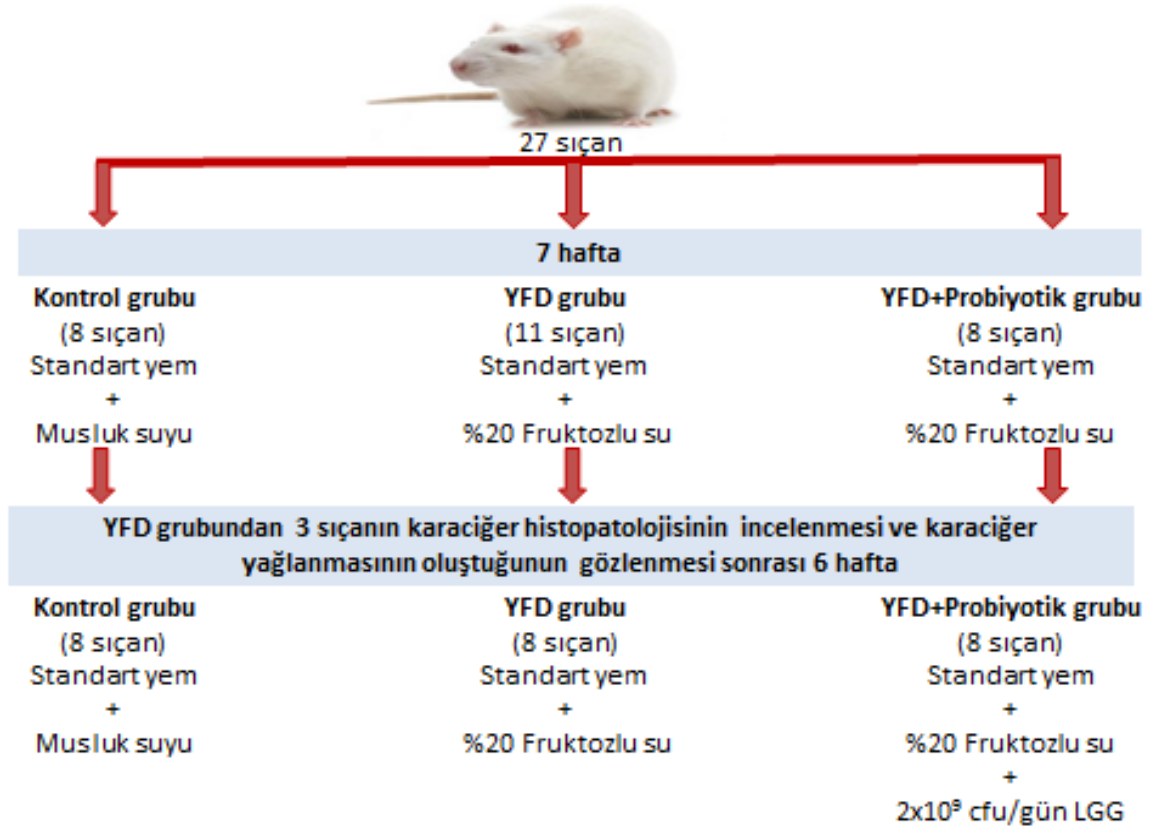
Tedavi edici olarak bakıldığında probiyotiklerin olası mekanizmaları şunları içermektedir: 1) TNF- α , KZYA, ROS ve LPS seviyelerindeki değişiklikler yoluyla konak mikrobiyotası ve gıda bileşenleri ile üretilen toksinleri azaltır; 2) konakçı patojenik ve kommensal mikrobiyal dengeyi korur; 3) konakçının adaptif ve doğuştan gelen bağışıklığını modüle eder [506]. Probiyotik türlerinden biri olan LGG'nin immünomodülatör etkilere sahip olduğu ve bağırsak tepkilerini modüle ederek faydalı etki gösterdiği bulunmuştur [507, 508]. Yüksek fruktozlu diyet ile indüklenen NAYKH'na karşı LGG'nin koruyucu özellik gösterdiği bulunmuştur [509]. Ayrıca bağırsak geçirgenliğini düzelttiği gösterilmiştir [510]. Bununla birlikte, LGG'nin beslenme girdilerini ve aşağı akış metabolik çıktılarla hormonal sinyalleşmeyi koordine eden yüksek fruktozlu bir diyet tarafından indüklenen sirkadiyen eşzamansızlığı doğrudan etkileyip etkilemediği belirsizliğini korumaktadır. Bu yüzden bu çalışmada probiyotik olarak LGG tercih edilmiştir.

Fruktoz alımı arttıkça endotoksin üretimi artar ve intestinal bariyer fonksiyonu için gerekli olan KZYA üretimi baskılanır. Bağırsak bariyerinin geçirgenliği artar ve jight junction protein ekspresyonu da artmaya başlar [511]. Sıçanların tolere edebilirliğine ve yapılan çalışmalara bakılınca genellikle tercih edilen miktar olarak bu çalışmada da %20'lik fruktoz solüsyonu tercih edilmiştir [500, 501, 512].

3.4. Deney Grupları ve Besin Desteği

Çalışmaya başlamadan önce standart hayvan yemleri “Arden Araştırma Deneysel Tıp Malzemeleri” firması tarafından hazırlanmıştır. Yem %62,89 karbonhidrat (yemin %3,64'ü ham posa yani selülozdur ve sıçanlarda sindirilememektedir), %22,0 protein, %8,07 yağ,

%6,04 ham kül (mineral) ve %1 vitaminden oluşmaktadır. Sıçanların detaylı yem bileşimi EK-2’de belirtilmektedir. Deney protokolü ise Şekil 3.1’de belirtilmiştir.



Şekil 3.1. Deney protokolü

Hayvanlar, çalışma öncesinde deney hayvanları üretim merkezinden alınıp deney hayvanları laboratuvarına taşınmış ve taze içme suyu ve standart yemleri ad libitum olarak sağlanarak bir hafta uyum süresi beklenmiştir. Çalışma öncesi sıçanlar rastgele bir şekilde 3 gruba ayrılıp 1. ve 3. grupta 8 ve 2. grupta 11 hayvan olacak şekilde yerleştirilmiştir (Resim 3.1). Hayvanların doğal gece-gündüz siklusları (12 saat aydınlık / 12 saat karanlık) korunarak, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sabit oda ısısında havalandırma sisteminin mevcut olduğu bir ortamda her kafeste 2 adet olacak şekilde barındırılmış; yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak sağlanmıştır. Haftada 1 kez kafesler değiştirilip temiz talaş eklenmiştir.



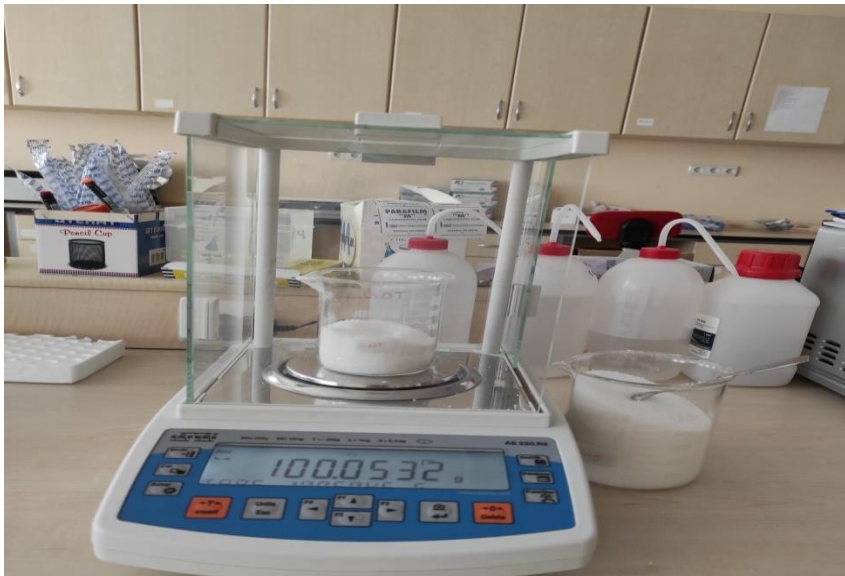
Resim 3.1. Sıçanların gruplara ayrılması ve barınma koşulları

Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı sıçan modeli oluşturulacak grupların (2. ve 3. gruplar) 6 hafta standart yem ve %20 fruktozlu su ile kontrol grubunun (1.grup) ise sadece standart yem ve içme suyu ile beslenmesi sağlanmıştır. Altı haftanın sonunda %20 fruktoz solüsyonu ile beslenen gruptan (2.grup) üç (3) hayvana ötenazi uygulanıp karaciğer yağlanması modeli olup oluşmadığına bakılmıştır. Karaciğerin patolojik incelemesi sonrası yağlanmanın oluşmaya başlaması gözlenince uzman hekim önerisi doğrultusunda yağlanmanın daha fazla artmasının beklenmesi için 1 hafta daha ek süre talep edilmiştir. Yedi haftanın sonunda NAYKH oluşturulan 3. gruba probiyotik tedavisi uygulanmıştır. Bu aşamada %20'lik fruktoz uygulanmaya devam edilmiştir. Probiyotik tedavisi ile 2×10^9 cfu/ml LGG oral olarak gavaj yoluyla her gün 2 mL serum fizyolojik içerisinde ikişer damla olarak verilmiştir (Resim 3.2). Probiyotik takviyesi için ticari bir firmanın damla formu ($5 \times 10^9/5$ damla LGG canlı bakteri içeriğine sahip) kullanılmıştır. Probiyotik ürün ışıktan korunup, 20°C 'nin altında muhafaza edilmiştir.



Resim 3.2. Sıçanlara gavaj yoluyla probiyotik uygulanması

Fruktoz ile zenginleştirilmiş su haftada 2 defa değiştirilmiştir. Kullanılan fruktoz, LevoSweet Crystalline Fructose (Fruktoz $>99,5\%$; pH: 5-7; nem: max 0,2)'dur. Fruktozlu su laboratuvar koşullarında kristalize fruktozun hassas terazi ile ölçümü (Resim 3.2) sonrası içme suyu ile gerekli oran sağlanarak ağırlık/hacim formülüne dayanarak haftada 2 kere taze olarak hazırlanmıştır. %20 fruktozlu su hazırlamak için 20 g fruktoza musluk suyu eklenerek çözündürülmüş ve toplamda 100 mL'ye tamamlanmıştır. Su şişeleri bakteri gelişimini önlemek için haftada 2 kere sterilize edilmiştir.



Resim 3.3. Fruktoz miktarının hassas terazi ile ayarlanması

3.5. Verilerin Toplanması ve Ölçüm Yöntemleri

Sıçanların yem ve su tüketme durumu kontrolü haftada 1 gün ve vücut ağırlığı, boy uzunluğu ve abdominal çevre ölçümü deneyin başında, ortasında ve sonunda aynı saatte ve aynı sırayla yapılmıştır (Resim 3.4).



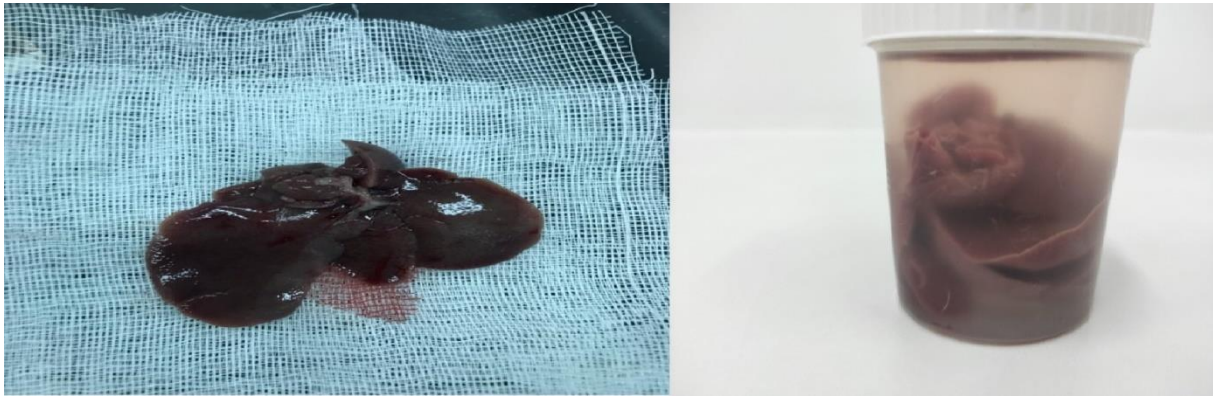
Resim 3.4. Sıçanların boy uzunluğu, vücut ağırlığı ve bel çevresi ölçümleri

13 haftalık çalışmanın sonunda, 12 saat aç bırakıldıktan sonra sıçanların anestezi maddeden etkilenmemesi için anestezişiz dekapitasyon yöntemi uygulanarak ötenazi yapılmıştır. Sıçanların boyunlarından yaklaşık 5 cc kan örnekleri alındıktan sonra vücudun ventral tarafından uzunlamasına bir kesi yapılarak cerrahi prosedüre geçilmiştir (Resim 3.5). On üç haftanın sonunda sıçanlardan alınan kan örneği sarı kapaklı jelli biyokimya tüpüne alınarak 4°C’de 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Böylelikle eritrosit ve plazma hemolizati elde edilmiştir. Üstte kalan serum kısmı pipet ile eppendorf türlere alınmıştır. Tüplerin üzeri numaralandırılmıştır. Alınan kan örnekleri biyokimya testi için -20°C’de muhafaza edilmiştir.



Resim 3.5. Sıçanların batin bölgesinin açılması

Sıçanların karaciğer doku ağırlıkları tartılmış ve kayıt altına alınmıştır. Karaciğer tartılmadan önce çıkarılıp gazlı bir bezle kurutulmuştur. Karaciğer rezeksiyonu yapıldıktan sonra yarısı alimünyum folyoya sarılarak biyokimyasal parametreler için -80°C’de muhafaza edilmiştir. Diğer yarısı %10’luk formaldehit solüsyonuna konularak histopatolojik değerlendirme için muhafaza edilmiştir (Resim 3.6).



Resim 3.6. Karaciğer dokusunun çıkartılması ve formaldehit solüsyonuna konulması

Karaciğer indeksi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır [513].

“Bir organ indeksi = bir organın ağırlığı (g) / bir vücudun ağırlığı (g) x 100”

3.5.1. Sıvı ve yem tüketimi ile enerji alım hesabı

Her sıçan için sıvı ve yiyecek alımları, kafeslere eklenen miktarlardan kalan miktarların çıkartılarak ölçülmesi ile elde edilmiştir. Kalori miktarı ise her gün tüketilen yiyecek ve fruktoz miktarının karşılık gelen referans kalori değeri ile çarpılmasıyla elde edilmiştir [514]. Ortalama enerji alımı için 1g sıçan yemi = 2,7 kkal ve 1 g fruktoz = 4 kkal enerji sağlamaktadır. %20'lik fruktozlu sudan (2g/10 ml = 0.8 kkal/ml) elde edilen enerji 0,8 kkal/ml olarak hesaplanmıştır.

Besinlerden alınan enerji (kkal/gün) = hayvan başına günlük gıda tüketim ortalaması x 2,7

Fruktozlu sudan alınan enerji (kkal/gün) = hayvan başına günlük ortalama su tüketimi x 0.8 olarak hesaplanmıştır.

3.5.2. Fizyolojik parametreler

Obezite göstergesi olarak abdominal çevre ve BKİ ve Lee indeksi için vücut ağırlığı ve boy uzunluğu deneyin başında, ortasında ve sonunda ölçülmüştür. Vücut ağırlığı elektronik tartı kullanılarak ölçülmüştür. Vücut ağırlığı artışı, son ağırlıktan ilk ağırlık çıkartılarak hesaplanmış ve yüzdesi aşağıdaki formüller ile belirlenmiştir.

Ağırlık değişimi 1 (%): (7.hafta vücut ağırlığı - başlangıç vücut ağırlığı) / Başlangıç vücut ağırlığı x 100

Ağırlık değişimi 2 (%): (13.hafta vücut ağırlığı - 7.hafta vücut ağırlığı) / 7.hafta vücut ağırlığı x 100

Ağırlık değişimi 3 (%): (13.hafta vücut ağırlığı - başlangıç vücut ağırlığı) / Başlangıç vücut ağırlığı x 100

Sıçanların boy uzunlukları; nazal ve anal bölge arasının cetvel ile ölçümü yoluyla hesaplanmıştır [515]. Boy uzunluğu artışı, son boy uzunluğundan ilk boy uzunluğu çıkartılarak hesaplanmış ve yüzdesi aşağıdaki formüller ile belirlenmiştir.

Boy uzunluğu değişimi 1 (%): (7.hafta boy uzunluğu -başlangıç boy uzunluğu) / Başlangıç boy uzunluğu x 100

Boy uzunluğu değişimi 2 (%): (13.hafta boy uzunluğu - 7.hafta boy uzunluğu) / 7.hafta boy uzunluğu x 100

Boy uzunluğu değişimi 3 (%): (13.hafta boy uzunluğu - başlangıç boy uzunluğu) / Başlangıç boy uzunluğu x 100

Beden kütle indeksi, ağırlığın (g) boy uzunluğuna (cm²) bölünmesiyle hesaplanmıştır [516]. Abdominal evre, mezura kullanılarak n karın çevresinde santimetre cinsinden ölçüm yapılarak belirlenmiştir [516]. İnsanlarda obezitenin değerlendirilmesi için kullanılan BKİ'nin eşdeğerı olarak sıçanlarda Lee indeksine bakılmaktadır [516]. "Lee indeksi = vücut ağırlığının kp kökü (g) / burun-anüs uzunluğu (cm)" formülü ile hesaplanmıştır.

3.5.3. Biyokimyasal parametreler

Biyokimya testi için muhafaza edilen kan rnekleri -20°C'den alınıp çözdürülüp gerekli testlere tabi tutulmuştur.

Glikoz, total kolesterol, GGT, AST ve ALT

Glikoz, total kolesterol, GGT, ALT ve AST değerlerinin tayini Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Test sonuçları için saatte 2400 teste bakılabilen "ADVIA 2400 Chemistry System" spektrofotometri cihazı (Glukoz IVD, kit enzim spektrofotometri) kullanılmıştır.

Zonulin (µg/mL), IL-6 (ng/L), IL-1β (pg/mL) ve insülin (pg/mL)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) eşitlerinden olan Sandwich yöntemi (Nonkompetitif ELISA) kullanılmıştır. Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, rat zonuline (veya IL-6 veya IL-1β veya insülin) zg bir antikorla önceden kaplanmıştır. Numuneler veya standartlar, mikro ELISA plaka kuyularına eklenmiştir ve spesifik antikor ile birleştirilmiştir. Daha sonra rat zonulin veya IL-6 veya IL-1β veya insülin ve Avidin-

Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikoru, her bir mikro plaka kuyusuna art arda eklenmiştir ve inkübe edilmiştir. Serbest bileşenler yıkanmıştır. Substrat çözeltisi her kuyuya eklenmiştir. Yalnızca rat zonulin veya IL-6 veya IL-1 β veya insülin, biyotinlenmiş saptama antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklar mavi renkte görünmüştür. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırılmıştır ve renk sararmıştır. Optik yoğunluk, 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. OD değeri, rat zonulin veya IL-6 veya IL-1 β veya insülin konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin OD'sini standart eğriyle karşılaştırarak numunelerdeki rat zonulin (veya IL-6 veya IL-1 β veya insülin) konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Melatonin (pg/mL)

Bu ELISA kitinde, Competitive-ELISA ilkesi kullanılmıştır. Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, melatonin ile önceden kaplanmıştır. Reaksiyon sırasında, numunedeki veya standarttaki melatonin, melatonine özgü Biyotinlenmiş Saptama Ab üzerindeki siteler için katı faz destekçisi üzerinde sabit miktarda melatonin ile rekabet etmektedir. Fazla konjugat ve bağlanmamış numune veya standart yıkanmıştır ve her mikro plaka kuyusuna HRP konjugatı eklenmiştir ve inkübe edilmiştir. Daha sonra her kuyucuğa bir 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrat solüsyonu eklenmiştir. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonu eklenerek sonlandırılmıştır ve renk maviden sarıya dönmüştür. Optik yoğunluk (OD), 450 nm $\pm$ 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Test edilen numunelerdeki melatonin konsantrasyonu, numunelerin OD'sini standart eğriyle karşılaştırarak hesaplanabilmiştir.

Süperoksit dismutaz (SOD, U/ml)

Süperoksit dismutazın rolü, oksidatif enerji süreçleri sırasında üretilen toksik radikalin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırmaktır. Bu yöntem, kırmızı bir formazan boyası oluşturmak üzere 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride ile reaksiyona giren süperoksit radikallerini oluşturmak için ksantin ve ksantin oksidaz kullanır, SOD aktivitesi daha sonra bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür. Spektrofotometre de 340 nm'de absorbanstaki azalma ölçülür.

Glutasyon peroksidaz (GPx, U/L)

Bu yöntem, Paglia ve Valentine yöntemine dayanmaktadır. GPx, glutasyonun kümen hidroperoksit tarafından oksidasyonunu katalize eder. Glutasyon varlığında, NADPH'nin NADP'ye oksidasyonu ile birlikte hemen indirgenmiş forma dönüştürülür. Spektrofotometre de 340 nm'de absorbanstaki azalma ölçülür.

Malondialdehit (nmol/mL)

Karataş ve diğerlerinin (2002) metodu modifiye edilerek, Tris tamponu ile homojenize edilen süpernatant kısımdan 1 mL alınarak, %10'luk perklorik asit (PCA) ile muamele edilerek proteinler çöktürülmüştür [517]. Karışım 5000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım viallere alınarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)'de analizi yapılmıştır. Analiz için ful otomatik sistem Shimadzu marka (Kyoto Japan) kullanılmıştır. Mobil faz olarak 30 mmol KH₂PO₄ ve metanol karışımı (%82-%18, H₃PO₄ ile pH=3,6), kolon olarak da ODS-3 kolonu (150 mm x 4,6,5 µm) kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1 mL/dk ve DAD dedektörünün dalga boyu 244 nm'de belirlenmiştir.

Glutasyon (mg/mL)

Redükte glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG) tayini için 1 mL kan serum örnekleri alınmıştır ve %10'luk PCA ile muamele edilerek proteinler çöktürülmüştür. Karışım 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım otosampler viallere alınarak, HPLC'de analizi yapılmıştır. Analiz için mobil faz olarak 50 mmol NaClO₄ (%0.1 H₃PO₄) tamponu kullanılmıştır. Analiz için ODS 3 HPLC kolonu (150 mm x 4,6,5 µm) kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1,0 mL/dk ve DAD dedektörünün dalga boyu 215 nm olarak belirlenmiştir. Ölçümler Labsolution 5.67 (Kyoto, Japan) programı kullanılarak hesaplanmıştır [518]. Daha sonra GSH/GSSG oranına bakılarak oksidatif stres oranı değerlendirilmiştir.

3.5.4. Karaciğer dokusunda yapılan incelemeler

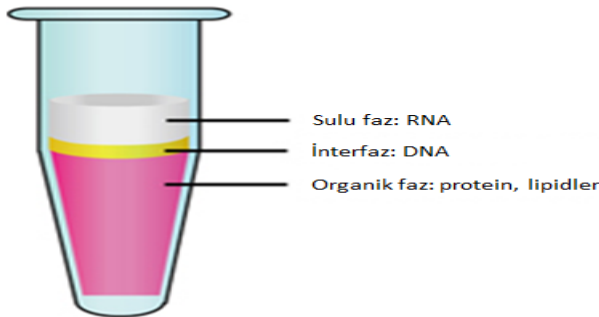
Yirmi dört adet kontrol ve hedef sıçan karaciğer dokusu numunelerindeki Bmal1, Clock, Rev-Erba ve Per2 genlerinin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi için hassas bir yöntem

olan RT-qPCR analizleri yapılmıştır. Bu analizde hasta grubu baz alınarak kontrol grubunun kat değişimi Fold Change (FC) ile hesaplanmıştır ve referans normalizatör olarak da beta aktin (ACTB) housekeeping geni kullanılmıştır.

Tüm analiz gruplarının gen ekspresyon analizlerinin değerlendirilmesinde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, 2001) metodu kullanılmıştır [519]. Hasta grubu baz alınarak kontrol grubunun kat değişimi (Fold change, FC) hesaplanmıştır. Normal dağılımları onaylanan çoklu grupların kıyaslamalarının birlikte değerlendirilmesi için ANOVA testi uygulanmıştır.

Total RNA ekstraksiyonu

Yüksek kalitede Total RNA izolasyonu için TRIzol Reagent kullanılmıştır, TRIzol Reagent kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemleri faz ayrımı ve bir dizi nükleik asit çöktürme temeline dayanmaktadır.



Resim 3.7. Total RNA ekstraksiyonu

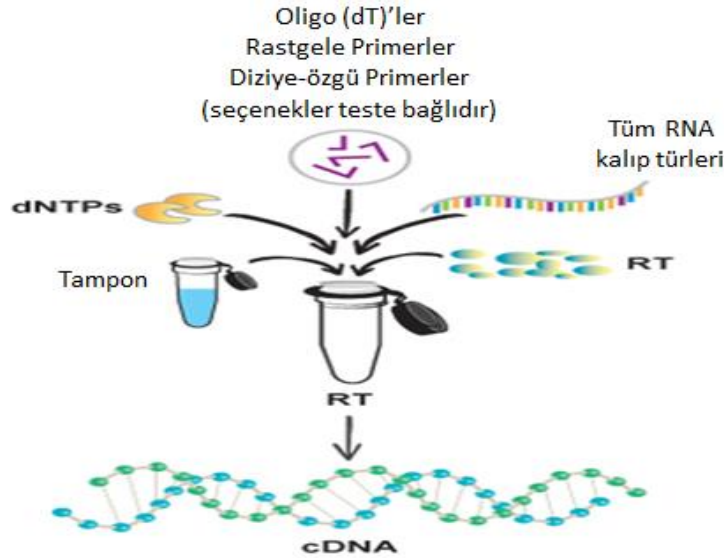
Nükleik asitlerin kantitatif analizi

qRT PCR analizinden önce tüm numunelerden elde edilen Total RNA miktarı (ng), tutarsız sonuçların önlenmesi için aynı miktara sabitlenir.

Ters transkriptaz (Reverse transkriptaz, cDNA) işlemi

mRNA gen ekspresyonu çalışmalarında pre-mRNA ve mature-mRNA yapılarının tespiti için oligo(dT) ve random hexamer primerleri ile ters transkripsiyon işlemi yapılmaktadır. Bu primerler mRNA zincirini uzatarak bir yapıyı kararlı hale getirmektedir. Daha sonra ters transkriptaz enzimi mRNA dizisinin karşı kopyasını sentezlemektedir. Elde edilen

tamamlayıcı DNA (Complementer DNA, cDNA), standart PCR için bir şablon olarak kullanılabilir.



Resim 3.8. Ters transkriptaz işlemi

RT: ters transkriptaz, cDNA: tamamlayıcı DNA, dNTPs: DNA nükleotid bazları

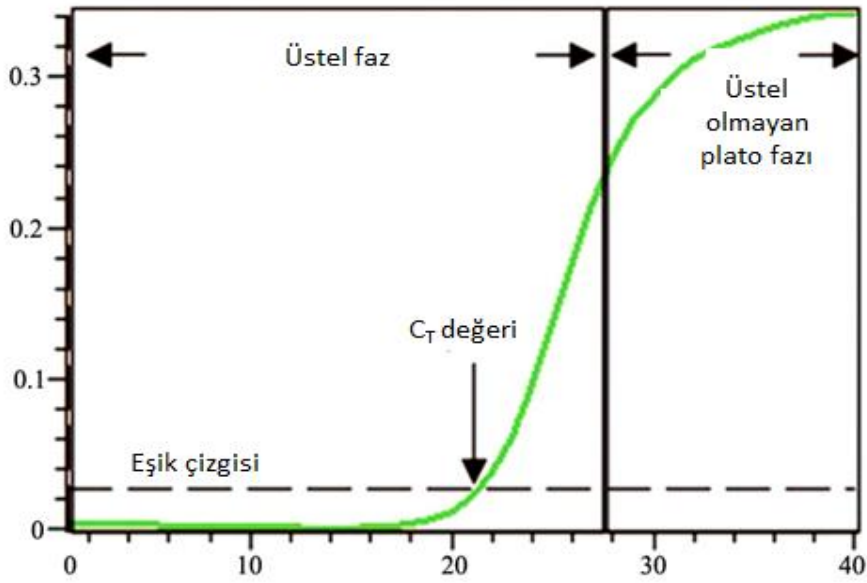
RT-qPCR ve mRNA gen ekspresyon analizleri

Son aşamada mRNA dizileriyle oluşturulan cDNA zincirleri, relative ekspresyon analizlerinde kullanılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarında bulunan numunelerin herbiri için, ilgili mRNA ve ona uygun referans genine ait dizilerin real time PCR ile 40 döngü amplifiye edilmiştir. İşlem sonucunda cihazdan alınan veriler $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ metodu ile değerlendirilmiştir (Çizelge 3.1) [519]. Florasan değerinin eşik değerini geçtiği (Threshold çizgisini kestiği) noktadan alınan eşik değeri (Ct, Cp, Cq) hesaplamalarda kullanılmıştır (Resim 3.9).

Çizelge 3.1. Gen ekspresyon metodu ($2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ Livak Metodu)

Grup	Hedef Gen	Referans Gen
Hasta örnek	A	A*
Kontrol örnek	B	B*
$2^{-(\Delta\Delta C_t)} = 2^{-[(\Delta C_t(A) - \Delta C_t(A^*)) - (\Delta C_t(B) - \Delta C_t(B^*))]}$		

*Gen ekspresyon çalışmasında standardizasyon için kullanılan referans gen sonucu



Resim 3.9. Threshold çizgisi ile eşik değerinin belirlenmesi

Nükleik asit izolasyon işlemi

1. Wistar albino sıçan türüne ait karaciğer numunelerinden 50-100 mg doku mikrosantrifuj tüplere aktarılarak içerisine 1 ml TRIzol reagent solüsyonu ve manyetik boncuk ilave edilmiştir.
2. Doku Süspansiyonları FP120 FASTPREP (Thermo, USA) homojenizatör cihazında 4.0 G hızda 20 sn parçalanmıştır.
3. Liziz ve faz ayrımı işlemlerini gerçekleştirmek üzere süspansiyon oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir.
4. Hazırlanan lizat 12000 G hızda 10 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir ve süpernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır.
5. Süspansiyona 200 µl kloroform eklenerek, dikkatlice karıştırılmıştır.
6. Oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra 12000 G hızda 10 dk +4°C sıcaklıkta santrifüj işlemi uygulanmıştır.

7. Farklı bir mikrosantrifuj tüpe aktarılan süpernatant içerisine 0,5 ml isopropanol eklenerek dikkatlice karıştırılmıştır.
8. Karışım 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12,000 G hızda 10 dk +4°C sıcaklıkta santrifuj işlemi yapılmıştır.
9. Süpernatant kısmı atılarak oluşan nükleik asit pelleti 1 ml %75 etanol ile 7500 G hızda 5 dk +4°C sıcaklıkta tekrar santrifuj yapılarak yıkanmıştır.
10. Üst faz mikrosantrifuj tüpünden uzaklaştırılarak, RNA pelleti kuruyana kadar (15-30 dk) oda sıcaklığında bekletilmiştir.
11. 300 µl nükleaz bulunmayan elüsyon tamponu eklenerek pellet süspanse edilmiştir, elde edilen numunelere ait total RNA'lar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Nükleik asit miktar tayini

- **Colibri Titertek Berthold cihazı kullanılarak** numunelerin RNA ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin aşamaları;
 1. Cihaz çalıştırıldıktan sonra nükleik asit sekmesi seçilerek, örnek tipi RNA-40, ışık yolu uzunluğu otomatik olacak şekilde parametreler ayarlanmalıdır.
 2. Cihaz kapağı açıldıktan sonra elüsyon tamponundan 2 µl eklenerek körleme işlemi yapılmıştır.
 3. Numunelerden sırasıyla 2 µl alınıp ölçüm seçeneği ile RNA miktarı kantitatif olarak belirlenmiştir.

Gen Ekspresyon Primer Tasarım ve Bağlanma Sıcaklıkları (T_m)

Çalışma kapsamında RT-qPCR yöntemi kullanılarak Bmal1, Rev-Erb Alpha, Per2 ve Clock genlerinin ekspresyon seviyeleri saptanmıştır.

RT-qPCR işlemleri ABI 7500 Fast (Thermo, USA) cihazında gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR cihazları her döngü sonunda floresan şiddetini saptayan fluometre ve termal döngüleyicilerden meydana gelmektedir. Ters transkripsiyon işlemiyle RNA'lerden çift iplikli yapıya dönüştürülen cDNA zincirleri arasına girerek floresan ışıma veren SYBR Green I boyası, gen ekspresyon analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline, UK) kullanılmıştır. Tasarımları tamamlanan primer dizilerinin optimum bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

Her bir gen bölgesi için uygun erime sıcaklığı (Melting time, T_m) değerinde reaksiyon kurulumları gerçekleştirilmiş ve döngü eğrileri (Melting curve) verileri incelenmiştir. Melting curve eğrisi; DNA zincirinin ayrılma özelliğinden faydalanarak çift iplik yapının denatüre olduğu sıcaklığın tespit edilmesini sağlayan RT-qPCR erime eğrisidir.

Çizelge 3.2. Gen ekspresyon primer tasarım ve bağlanma sıcaklıkları

Primer Adı	Sekans (5'→3')	Uzunluk	T _m °C	Amplikon length
PER2_rno_F	GCAGTGGCTTAGATTCTT	18 bp	61 °C	89 bp
PER2_rno_R	CTCATTCTCGTGGTGTTC	18 bp		
REV-ERB ALPHA_rno_F	GGCAACACCAAGAATG	16 bp	59 °C	220 bp
REV-ERB ALPHA_rno_R	CCATCAGCACCTCAAA	16 bp		
BMAL1_rno_F	CCTCATGGAAGGTTAGAA	18 bp	59 °C	122 bp
BMAL1_rno_R	GAAGCCAATTCGTCAATA	18bp		
CLOCK_rno_F	CACACTGTAGTAAGTTATGC	20 bp	61 °C	145 bp
CLOCK_rno_R	GTGCTTCCTTGAGACTC	17 bp		
ACTB_rno_F	GAAGATCAAGATCATTGCTCCT	22 bp	59 °C	84 bp
ACTB_rno_R	TGGAAGGTGGACAGTGAG	18 bp		

Sensifit (bioline) cDNA kit reverse transcriptase işlemi

1. Buz üzerinde steril tüp içerisinde aşağıdaki bileşenler hazırlanmıştır.
2. Kısa bir vorteks ve spin yapılmıştır.

3. Ters transkripsiyon işlemi için ABI Veriti 96 cihazı kullanılmaktadır. PCR cihazı ters transkripsiyon işlemi için kullanılarak protokole göre hazırlanmıştır.

- 25 °C 10 dk primer bağlaması
- 42 °C 15 dk reverse transkripsiyon işlemi
- 85 °C 5 dk enzim inaktivasyonu

4. Reaksiyon sonunda enzim, 85°C’de 5 dk’da inaktive edilerek, cDNA ürünleri -20°C’de uzun süre muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.3. Enzim inaktivasyonu

Komponentler	Miktar
Total RNA	Değişken
5x TransAmp Buffer	4 µl
Reverse Transkriptaz	1 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	20 µl ’ye tamamla

SeniFAST™ SYBR No-ROX Kit mRNA gen ekspresyonu

1. Soğuk blok üzerinde aşağıdaki tabloya göre bileşenler hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. Soğuk blok üzerinde hazırlanan bileşenler

Komponentler	Derişim	Miktar 1X
2x SensiFAST SYBR® No-ROX Mix	2x Mastermix (1,5) buffer	10 µl
mRNA MixB (Primer)	F & R	3,5 µl
mRNA cDNA	10-50 ng	3 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	-	3,5 µl

2. Termal döngüleyici PCR reaksiyonu aşağıdaki tabloya göre ayarlanmıştır.

Çizelge 3.5. Termal döngüleyici prosedürü

PCR Aşaması	İşlem	Sıcaklık/Derece	Tekrar
İlk Denatürasyon	Denatürasyon	95°C -5 dk	1
PCR Aplikasyon	Denatürasyon	95°C -5 sn	40
	Bağlanma	60°C - 30 sn (Okuma)	
Final	Soğutma	40°C 30 sn	1

3. PCR ürünlerine ait pikler incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Primer dizilerinin sentezlerine ait bilgiler Çizelge 3.3'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.6. Tasarım kontrol listesi

Oligonükleotid Dizileri									
Sırası	Talep sebebi	Tipi	Firma	Oligo Adı	5' işaret	5-Diziler-3	3' işaret	Sentez Skalası	Saflaştırma Türü
1	H.A	DNA	Biomers	PER2_rno_F		GCAGTGGCTT AGATTCTT		50 nmol	HPLC
2	H.A	DNA	Biomers	PER2_rno_R		CTCATTCTCG TGGTGTTT		50 nmol	HPLC
3	H.A	DNA	Biomers	REV-ERB ALPHA_rno_F		GGCAACACCA AGAATG		50 nmol	HPLC
4	H.A	DNA	Biomers	REV-ERB ALPHA_rno_R		CCATCAGCAC CTCAAA		50 nmol	HPLC
5	H.A	DNA	Biomers	BMAL1_rno_F		CCTCATGGAA GGTTAGAA		50 nmol	HPLC
6	H.A	DNA	Biomers	BMAL1_rno_R		GAAGCCAATT CGTCAATA		50 nmol	HPLC
7	H.A	DNA	Biomers	CLOCK_rno_F		CACACTGTAG TAAGTTATGC		50 nmol	HPLC
8	H.A	DNA	Biomers	CLOCK_rno_R		GTGCTTCCTT GAGACTC		50 nmol	HPLC
9	H.A	DNA	Biomers	ACTB_rno_F		GAAGATCAAG ATCATTGCTC CT		50 nmol	HPLC
10	H.A	DNA	Biomers	ACTB_rno_R		TGGAAGGTG GACAGTGAG		50 nmol	HPLC

Real time PCR cihazı ile dublike çalışılan numunelerin Ct sonuçları ve Ct ortalama değerleri (mean), bir başka ifade ile cihazın ham verileri Çizelge 3.7'de verilmiştir. Ct mean değerleri ile 2^{-ddCt} ekspresyon katsayısı hesaplanmaktadır.

Gen ekspresyon analizlerinde numunelerin ekspresyon seviyelerini ifade etmek ve istatistiksel analizler için kullanılan katsayı değişimleri (Fold Change, FC) Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Numune Bilgileri ve qPCR Ct Mean Sonuçları

ID	NUMUNE NO	CLOCK CT1	CLOCK CT2	CLOCK CT Mean	BMAL CT1	BMAL CT2	BMAL CT Mean	REV CT1	REV CT2	REV CT Mean	PER CT1	PER CT2	PER CT Mean	ACTB CT1	ACTB CT2	ACTB CT Mean
1	1. grup 1. sıçan	22.72	23.12	22.92	21.57	20.81	21.19	26.33	26.88	26.60	24.47846031	24.64779854	24.56312943	20.88814545	20.96770859	20.92792702
2	1. grup 2. sıçan	24.24	24.30	24.27	22.41	22.17	22.29	28.56	28.96	28.76	24.54	24.51	24.53	21.74207306	22.25183487	21.99695396
3	1. grup 3. sıçan	22.13	21.84	21.99	21.03	21.76	21.39	23.68	24.53	24.11	22.79	23.32	23.06	19.60095596	19.75984383	19.68039989
4	1. grup 4. sıçan	25.18	25.13	25.16	22.31	23.00	22.65	30.30	30.37	30.34	25.15	25.74	25.45	22.8018837	23.00733566	22.90460968
5	1. grup 5. sıçan	23.14	22.94	23.04	23.91	22.16	23.03	28.12	26.12	27.12	24.35	23.79	24.07	18.9654007	18.99539375	18.98039722
6	1. grup 6. sıçan	22.27	22.62	22.45	21.57	21.43	21.50	25.63	26.18	25.91	24.25	23.54	23.89	21.14209938	21.41443253	21.27826595
7	1. grup 7. sıçan	32.42	31.67	32.04	33.14	34.28	33.71	27.97	27.95	27.96	29.09	29.71	29.40	20.75673294	20.8762207	20.81647682
8	1. grup 8. sıçan	24.88	24.99	24.93	23.72	24.78	24.25	25.62	28.84	27.23	24.70	24.97	24.84	23.78644562	24.39736176	24.09190369
9	2. grup 1. sıçan	25.39	25.47	25.43	23.92	26.02	24.97	30.57	30.29	30.43	26.47	27.03	26.75	22.52186584	23.08616638	22.80401611
10	2. grup 2. sıçan	28.15	27.75	27.95	33.80	35.82	34.81	29.52	31.48	30.50	26.61	27.40	27.00	26.19523811	26.29027748	26.2427578
11	2. grup 3. sıçan	24.79	24.72	24.75	24.69	24.64	24.66	28.77	29.73	29.25	27.26	26.32	26.79	22.93736076	23.82381439	23.38058758
12	2. grup 4. sıçan	29.90	30.73	30.32	30.13	28.79	29.46	34.54	33.01	33.78	33.36	33.82	33.59	27.40053177	27.69682884	27.54868031
13	2. grup 5. sıçan	26.74	26.92	26.83	26.09	27.19	26.64	28.07	27.47	27.77	27.57	28.79	28.18	25.9118042	26.04921722	25.98051071
14	2. grup 6. sıçan	22.07	21.96	22.02	19.07	20.44	19.76	25.21	25.00	25.11	25.14	24.92	25.03	22.00419235	22.07620811	22.04020023
15	2. grup 7. sıçan	21.74	21.48	21.61	21.92	21.52	21.72	25.10	25.30	25.20	22.13	23.79	22.96	22.40833282	22.51275635	22.46054459
16	2. grup 8. sıçan	26.50	26.37	26.44	26.63	27.44	27.04	30.81	31.46	31.14	26.03	25.46	25.75	25.88647842	26.02835464	25.95741653

Çizelge 3.7. (devam). Numune Bilgileri ve qPCR Ct Mean Sonuçları

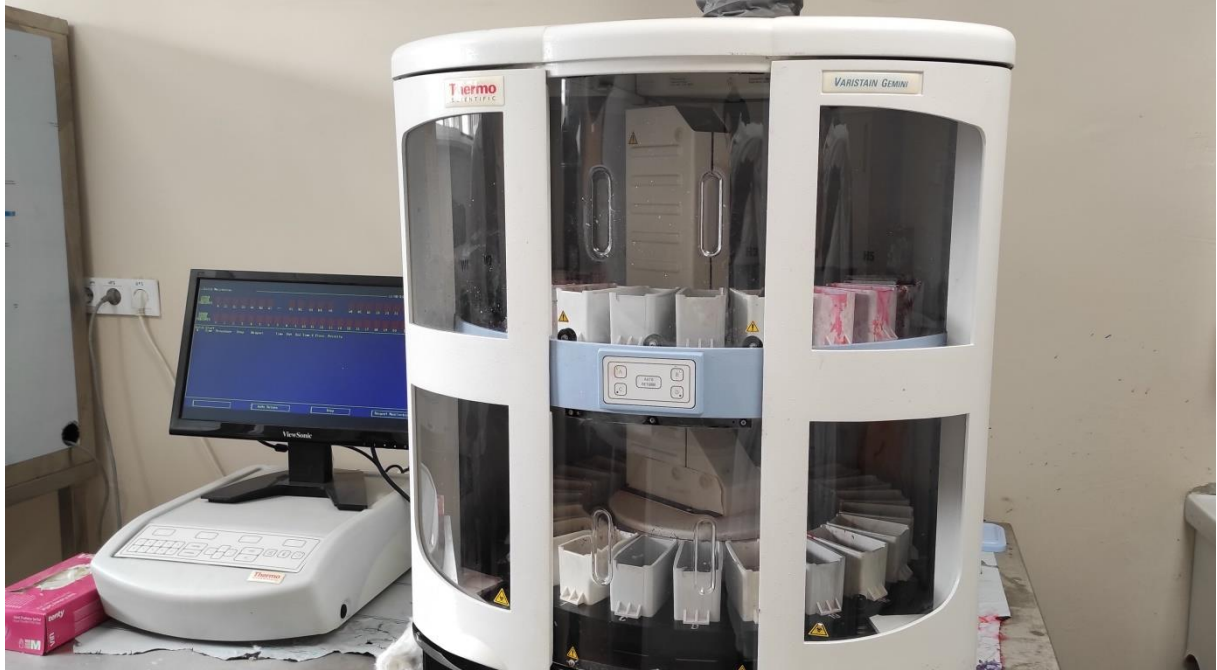
ID	NUMUNE NO	CLOCK CT1	CLOCK CT2	CLOCK CT Mean	BMAL CT1	BMAL CT2	BMAL CT Mean	REV CT1	REV CT2	REV CT Mean	PER CT1	PER CT2	PER CT Mean	ACTB CT1	ACTB CT2	ACTB CT Mean
17	3. grup 1. sıçan	30.10	29.58	29.84	30.89	29.98	30.44	31.16	28.16	29.66	29.83	30.87	30.35	28.14915276	28.37101746	28.26008511
18	3. grup 2. sıçan	26.90	26.65	26.78	26.47	26.63	26.55	31.45	32.20	31.83	27.64	28.46	28.05	25.60569572	25.9642849	25.78499031
19	3. grup 3. sıçan	22.92	23.08	23.00	24.03	25.40	24.72	25.59	25.77	25.68	23.83	24.35	24.09	21.97694969	22.3365097	22.1567297
20	3. grup 4. sıçan	26.84	26.79	26.82	29.07	27.77	28.42	32.04	33.93	32.99	29.11	28.61	28.86	25.61034584	25.92494011	25.76764297
21	3. grup 5. sıçan	23.88	24.06	23.97	22.36	22.57	22.46	27.05	27.95	27.50	25.71	27.41	26.56	23.58392715	23.87885857	23.73139286
22	3. grup 6. sıçan	27.46	27.43	27.45	26.85	28.41	27.63	30.12	30.91	30.51	27.41	29.59	28.50	26.79238892	26.88009644	26.83624268
23	3. grup 7. sıçan	24.10	24.24	24.17	24.21	23.37	23.79	26.15	25.82	25.98	26.89	25.97	26.43	23.4650631	23.2408905	23.3529768
24	3. grup 8. sıçan	25.86	25.53	25.70	25.90	25.76	25.83	29.71	29.91	29.81	27.34	28.01	27.68	25.65491104	25.5171566	25.58603382

Çizelge 3.2. Numunelere Ait Katsayı Değişimleri (Fold Change)

ID	NUMUNE NO	CLOCK FC (2 ^Δ -ΔΔCT)	log2 (CLOCK FC (2 ^Δ -ΔΔCT))	BMAL FC (2 ^Δ -ΔΔCT)	log2 (BMAL FC (2 ^Δ -ΔΔCT))	REV FC (2 ^Δ -ΔΔCT)	log2 (REV FC (2 ^Δ -ΔΔCT))	PER FC (2 ^Δ -ΔΔCT)	log2 (PER FC (2 ^Δ -ΔΔCT))
1	1. grup 1. sıçan	2.418930567	1.274369359	4.446176182	2.152565117	1.182832015	0.242245197	1.003775756	0.005437007
2	1. grup 2. sıçan	1.983472844	0.988028646	4.352385242	2.121806259	0.556074235	-0.8466506	2.156393929	1.108620753
3	1. grup 3. sıçan	1.946000769	0.96051228	1.630394727	0.705221291	2.810714184	1.490936756	1.20195261	0.265380015
4	1. grup 4. sıçan	2.020420006	1.014655232	6.363220009	2.669757004	0.350572299	-1.512216091	2.138493645	1.09659492
5	1. grup 5. sıçan	0.57639996	-0.79485786	0.322493527	-1.63265789	0.214757058	-2.219222546	0.365376295	-1.452545056
6	1. grup 6. sıçan	4.280024859	2.097619176	4.580909314	2.195634003	2.442352484	1.288271427	2.03347715	1.023948779
7	1. grup 7. sıçan	0.004008744	-7.962633967	0.000702529	-10.47515472	0.428044205	-1.224168301	0.032543277	-4.941496663
8	1. grup 8. sıçan	5.360275431	2.422307134	4.799316446	2.262828941	6.872353069	2.780804157	7.433595802	2.894060245
9	2. grup 1. sıçan	1.555108738	0.637015462	1.191874321	0.253232117	0.30631025	-1.706934452	0.809970394	-0.304058919
10	2. grup 2. sıçan	2.945319445	1.558424115	0.014102375	-6.147918015	3.163047982	1.661315441	7.362154451	2.880128016
11	2. grup 3. sıçan	3.713303344	1.892703176	2.199850541	1.13740551	1.036065715	0.051115513	1.173104497	0.230331531
12	2. grup 4. sıçan	1.41129623	0.497020841	1.421140073	0.507048759	0.807602692	-0.308282375	0.189245837	-2.401666532
13	2. grup 5. sıçan	5.331372668	2.414507031	3.384786388	1.759064789	17.49739633	4.129068356	2.710386524	1.438498607
14	2. grup 6. sıçan	9.770511883	3.288434148	26.05300424	4.703377838	7.216163625	2.851232052	1.568101941	0.649019351
15	2. grup 7. sıçan	17.3591959	4.117628217	8.944863669	3.161059494	9.057433008	3.17910223	8.82247845	3.141184001
16	2. grup 8. sıçan	6.889012084	2.784297109	2.532618357	1.340629692	1.671304004	0.740974178	14.45058456	3.853055949
17	3. grup 1. sıçan	3.218648187	1.686454892	1.183823138	0.24345356	22.92170967	4.51864275	2.929642287	1.550724521
18	3. grup 2. sıçan	4.834629033	2.273405194	3.152741289	1.656606789	0.918917604	-0.121992588	2.588932728	1.372357478
19	3. grup 3. sıçan	5.359637668	2.422135472	0.907097377	-0.140670662	5.263273377	2.395960331	3.269649792	1.709136119
20	3. grup 4. sıçan	4.651633129	2.217737317	0.85048097	-0.233649139	0.406459848	-1.29881525	1.463458991	0.549382319
21	3. grup 5. sıçan	8.149031534	3.026628613	12.86453713	3.685327644	4.441732684	2.15112257	1.754991958	0.811464419
22	3. grup 6. sıçan	6.295786596	2.65438664	3.083518788	1.624577637	4.723425014	2.239833355	3.936414357	1.976882091
23	3. grup 7. sıçan	5.45781453	2.448323369	3.954551127	1.983513947	9.767227396	3.287949085	1.474234675	0.559966197
24	3. grup 8. sıçan	8.900432668	3.15387547	4.505535808	2.171698685	3.236055338	1.694236279	2.930980009	1.551383128

3.5.5. Histopatolojik örneklerin incelenmesi

Her müdahale grubundan karaciğer örnekleri alınmıştır ve karaciğer dokusundaki olası histopatolojik değişiklikleri görselleştirmek için doku fiksasyonuna, kesitlere ve boyamaya tabi tutulmuştur. Yüksek fruktozlu diyetle indüklenen karaciğer yağlanmasını değerlendirmek için çıkartılan karaciğer %10'luk formalinde 3 gün bekletildikten sonra makroskopi laboratuvarında kesit alınmıştır. Doku kesitleri kasetlere konulmuş, kasetlere grup kodlamaları yazılmış ve kasetlerin üzeri kaset kapakları ile kapatılmıştır. Dokular daha sonra doku takip sepetine dizilmiştir. Doku takip sepeti, Donatello marka doku takip cihazına (doku takip cihazı solüsyonları; formol, etil alkol, ksilen ve parafin) bırakılmıştır ve 1 gece (yaklaşık 15 saat) cihazda bekletilmiştir. Sabah olunca kasetteki dokular alınıp doku gömme cihazı (Leica EG1150 H) ile parafin (mum) bloklara gömülmüştür. Parafin Gömme Modülü (Zenon) ile katılaşıncaya kadar soğutulmuştur. Daha sonra kasetlerden mikrotom cihazında (Thermo Scientific) 5 µ'luk kesitler alınmıştır. Ardından sıcak su banyosuna (Benmari) bırakılmıştır. Benmarideki parafinli doku lam üzerine alınmıştır. Daha sonra doku boyama sepetlerine dizilmiştir. Doku boyama cihazında (Thermo Scientific) Hemotoksilen-Eozin (H&E) boyama yapılmıştır (Resim 3.10).



Resim 3.10. Hemotoksilen-Eozin boyama cihazı

Karaciğer Dokusunda Hemotoksilen Eozin Protokolü;

- Ksilen, 3 ayrı şale ve her birinde 2 dakika bekletilir.
- Absolut alkol 10 kere daldırılır.
- %95'lik alkol, 2 ayrı kapa ve her birine 10 kere daldırılır.
- Musluk suyunda durulanır (su sıkça değiştirilmelidir).
- Hemoksilen, Mayer 15 dakika veya asidikleştirilmiş Harris 1-3 dakika bekletilir.
- Musluk suyu, 2 ayrı kapa, her birine 10 kere daldırılır (su sıkça değiştirilmelidir).
- Amonyaklı su, %0.25 veya mavileşene kadar lityum karbonat, %0.5 (Kesitler amonyaklı suda çalkalanmamalıdır).
- Musluk suyu, 2 ayrı kapa her birine 10 kere daldırılır (su sıkça değiştirilmelidir).
- Eozin, 10-20 kere daldırılır veya eozin-floksin 1-3 dakika bekletilir.
- Alkol, %70, 10-15 kere daldırılır.
- Alkol, %95, 10-15 kere daldırılır.
- Absolut alkol, 3 ayrı kap, her birine 10-15 kere daldırılır.
- Ksilen, 3 ayrı kap her birine 10-15 kere daldırılır.

Etüvde (Nüve EN 500) doku üzerindeki parafinin erimesi için 30 dk bekletildikten sonra Ksilende (benzindir, parafini eritir ve dokuyu parlatır) 10 dakika bekletilmiştir. Lamaların üzerine entellan (yapıştırıcı) damlatılarak lamelle kapatılmıştır. Daha sonra mikroskopta (Olympus, DP73) incelenmiştir (Resim 3.11).



Resim 3.11. Mikroskop cihazı

Histopatolojik inceleme körleme olarak ve histopatolojik sınıflama Kleiner sınıflamasına göre yapılmıştır. NAYKH aktivite skoru steatoz (0-3 arası skorlanır), lobüler inflamasyon (0-3 arası skorlanır) ve hepatoselüler balonlaşmanın (0-2 arası skorlanır) toplamıdır ve NASH'lı hastaların çoğu ≥ 5 NAYKH aktivite skoruna sahiptir [50]. Skorlama Çizelge 2.5'de belirtilmiştir ve toplam puan değerlendirilmiştir [186].

Çizelge 3.9. Alkolik olmayan yağlı karaciğer karaciğer biyopsisini değerlendirmek için NAS skorelama sistemi [186]

Bileşenler	Skor	Tanımlama	NAS (0-8) = Steatoz derecesi + inflamasyon derecesi + balonlaşma derecesi
Steatoz	0	<%5	0: Yok
	1	%5-33	1a: Hafif (hassas) zon 3 perisinusoidal fibrozis
	2	>%33-66	1b: Orta (yoğun) zon 3 perisinusoidal fibrozis
	3	>%66	2: Periportal fibrozis ile zon 3 perisinusoidal fibrozis
Balonlaşma	0	Yok	3: Köprü fibrozu
	1	Birkaç balon hücresi	4: Fibrozis
	2	Birçok hücre / Belirgin balonlaşma	
İnflamasyon	0	odak yok	
	1	<2 odak / 200x alan	
	2	2-4 odak / 200x alan	
	3	>4 odak / 200x alan	

3.6. Verilerin İstatistiksel Değerlendirmesi

Araştırmanın güç analizi ve örneklem büyüklüğü için G-Power 3.1.9.2 paket programı kullanılmıştır. İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 25.0 (IBM Corp., Armonk, New York, ABD) istatistik paket programı kullanılmıştır. Sürekli değişkenlere ait verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ve Q-Q grafikleri ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde betimleyici değerler için yüzde (%), medyan (M), 25.yüzdelik (interquantilerange 1, Q1), 75.yüzdelik (interquantilerange 3, Q3), ortalama ($\bar{x}$), standart sapma (SS) ve korelasyon katsayısı (r) olarak ifade edilmiştir. Parametrik olmayan testlerde genellikle M, Q1 ve Q3 kullanılmaktadır. Diyet müdahale gruplarının karşılaştırmasının anlamlılığı için Kruskal-Wallis H testi kullanılmıştır. Bir grubun ilişkili fakat farklı zamanları gösterir ölçüm yüzdeleri için Friedman iki yönlü varyans analizi kullanılmıştır. İki'den fazla grup karşılaştırmalarında anlamlı fark çıkması durumunda

Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır. Normal dağılıma uygun olmadığı belirlenen iki sayısal değişkenin ilişkisinin şiddet ve yönünün analizinde “Spearman Rank Korelasyon Katsayısı” kullanılmıştır. Bağımsız örneklem tek yönlü varyans analizinde ikiden fazla grubun karşılaştırmasında “One-Way Anova” testi uygulanmıştır. Farklı üst değerine (a, b, c, 1, 2, 3) sahip parametreler istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur.

Gruplar için tanımlayıcı istatistikler grafiklerle gösterilmiştir. Analiz sonuçları $p < 0.05$ anlamlılık düzeylerine göre yorumlanmıştır.





4. BULGULAR

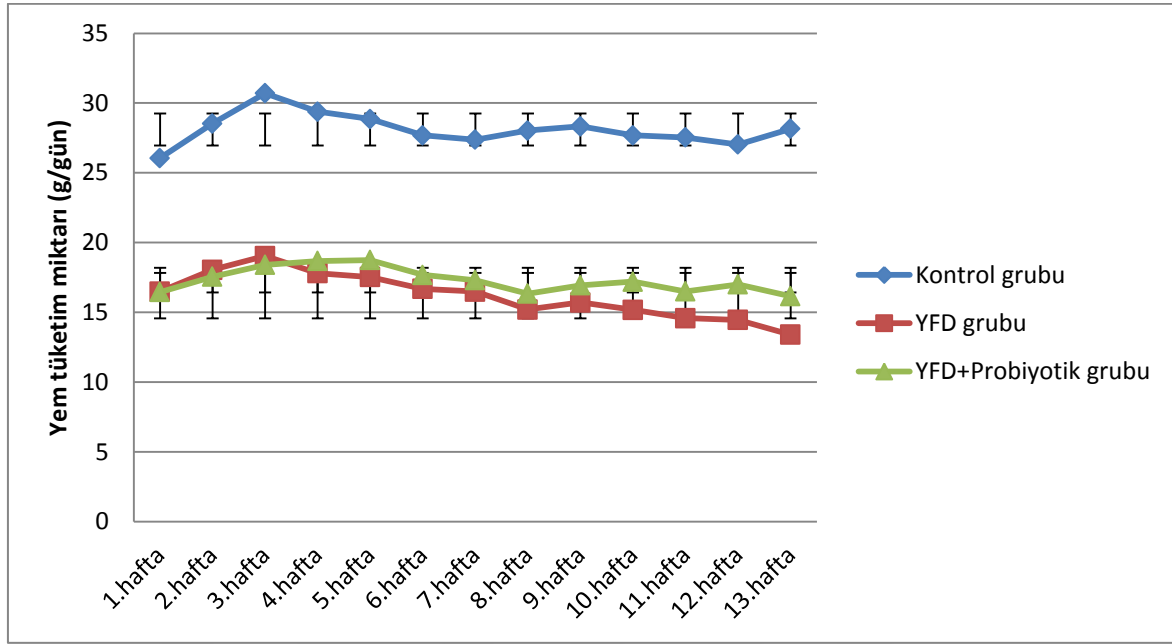
4.1. Sıçanların Yem ve Su Tüketim Durumları ile Enerji Alım Miktarları

Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre günlük ortalama yem tüketim miktarlarının M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1’de verilmiştir. Kontrol grubunun 1.haftada minimum (26,05 g/gün) ve 3.haftada maksimum (30,7 g/gün); YFD grubunun 13.haftada minimum (13,40 g/gün) ve 3.haftada maksimum (19,03 g/gün); YFD+probiyotik grubunun 13. haftada minimum (16,15 g/gün) ve 5. haftada maksimum (18,75 g/gün) yem tükettikleri saptanmıştır. Genel olarak 8.hafta dışında kontrol grubunun yem tüketim miktarı YFD ve YFD+probiyotik grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.1. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre günlük ortalama yem tüketim miktarları (g/gün)

	Kontrol^a	YFD^b	YFD+Probiyotik^c	p
	M (Q1; Q3)	M (Q1; Q3)	M (Q1; Q3)	
1. hafta	26,05 (24,23; 27,61)	16,48 (14,00; 17,19) ^a	16,45 (14,95; 17,95) ^a	0,024*
2. hafta	28,53 (27,68; 30,46)	18,05 (16,31; 19,08) ^a	17,55 (16,93; 19,15) ^a	0,024*
3. hafta	30,70 (28,74; 32,51)	19,03 (17,64; 19,59) ^a	18,40 (18,10; 19,30) ^a	0,024*
4. hafta	29,38 (28,70; 30,28)	17,80 (17,03; 19,14) ^a	18,68 (17,95; 19,74) ^a	0,021*
5. hafta	28,85 (28,45; 29,21)	17,53 (12,94; 18,66) ^a	18,75 (17,38; 20,58) ^a	0,018*
6. hafta	27,68 (27,19; 28,31)	16,68 (14,88; 18,21) ^a	17,68 (16,34; 19,28) ^a	0,018*
7. hafta	27,38 (26,84; 28,14)	16,48 (15,19; 17,39) ^a	17,30 (15,43; 18,95) ^a	0,023*
8. hafta	28,03 (27,09; 28,33)	15,20 (13,74; 18,20)	16,33 (15,14; 27,34)	0,077
9. hafta	28,33 (27,76; 29,08)	15,70 (14,81; 16,63) ^a	16,93 (16,08; 19,73) ^a	0,018*
10. hafta	27,68 (27,58; 28,38)	15,18 (13,48; 16,73) ^a	17,20 (15,19; 18,50) ^a	0,017*
11. hafta	27,53 (27,35; 28,26)	14,58 (13,65; 16,14) ^a	16,50 (15,89; 18,80) ^a	0,012*
12. hafta	27,03 (26,93; 27,16)	14,45 (13,81; 15,54) ^a	17,00 (15,98; 18,33) ^{a,b}	0,008*
13. hafta	28,15 (27,58; 28,88)	13,40 (12,13; 14,30) ^a	16,15 (14,00; 17,18) ^a	0,012*

*Kruskal-Wallis H Testi *Bonferroni düzeltmesi * $p<0,05$



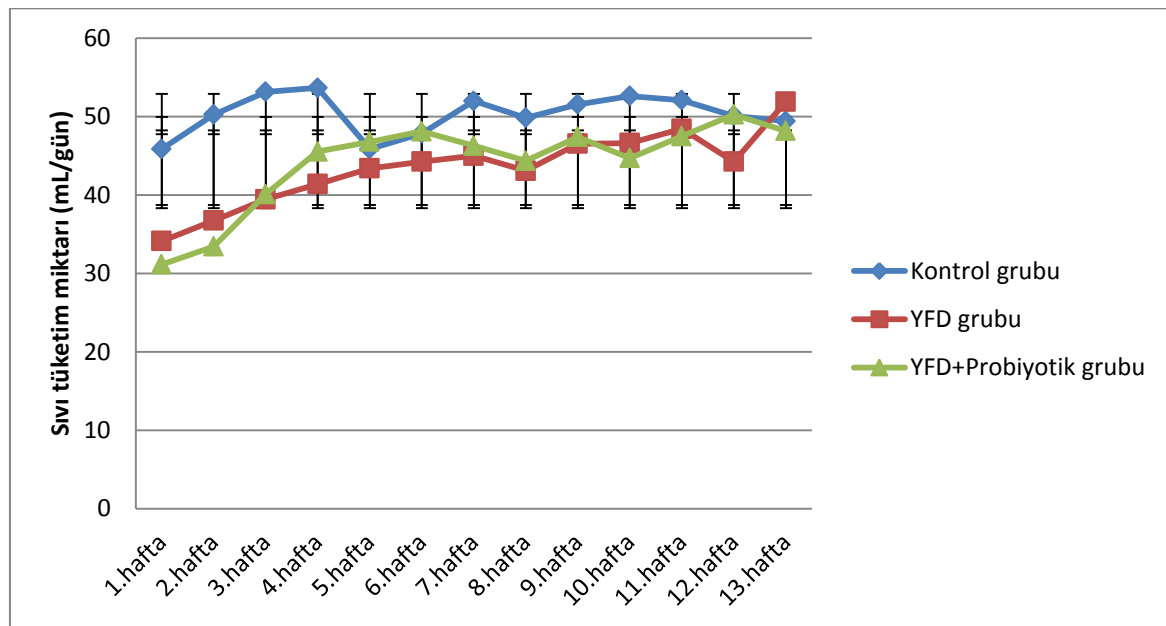
Şekil 4.1. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre yem tüketim miktarları (g/gün)

Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre günlük ortalama su tüketim miktarlarının M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2’de verilmiştir. Kontrol grubunun 1. hafta ve 5. haftada minimum (45,85 mL/gün) ve 4. haftada maksimum (53,65 mL/gün); YFD grubunun 1. haftada minimum (34,13 mL/gün) ve 11.haftada maksimum (48,43 mL/gün); YFD+probiyotik grubunun 1. haftada minimum (31,15 mL/gün) ve 5. haftada maksimum (50,23 mL/gün) yem tükettikleri saptanmıştır. 1., 2., 3. ve 4. haftalarda kontrol grubunun sıvı tüketim miktarı YFD ve YFD+probiyotik grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Diğer haftalarda gruplar arası su tüketimi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 4.2. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre günlük ortalama su tüketim miktarları (mL/gün)

	Kontrol ^a	YFD ^b	YFD+Probiyotik ^c	p
	M (Q1; Q3)	M (Q1; Q3)	M (Q1; Q3)	
1. hafta	45,85 (44,83; 47,25)	34,13 (29,13; 35,90) ^a	31,15 (28,91; 33,58) ^a	0,021*
2. hafta	50,23 (46,18; 51,20)	36,73 (35,15; 44,79) ^a	33,43 (32,30; 36,76) ^a	0,021*
3. hafta	53,13 (48,06; 54,55)	39,45 (38,34; 40,86) ^a	40,10 (35,43; 42,79) ^a	0,024*
4. hafta	53,65 (49,46; 55,59)	41,38 (36,79; 44,54) ^a	45,53 (38,11; 49,94) ^a	0,024*
5. hafta	45,85 (43,56; 50,54)	43,38 (37,54; 46,25)	46,78 (38,29; 50,61)	0,472
6. hafta	47,83 (44,26; 53,19)	44,23 (38,14; 50,28)	48,10 (43,04; 50,16)	0,626
7. hafta	51,98 (49,28; 55,16)	45,00 (37,58; 49,46)	46,25 (42,76; 50,26)	0,077
8. hafta	49,83 (45,73; 58,46)	43,08 (36,54; 48,56)	44,35 (41,38; 53,14)	0,199
9. hafta	51,55 (49,99; 58,18)	46,53 (38,05; 53,43)	47,38 (42,93; 51,75)	0,309
10. hafta	52,60 (49,55; 58,80)	46,60 (40,95; 53,49)	44,68 (41,16; 52,46)	0,309
11. hafta	52,08 (48,36; 54,59)	48,43 (43,39; 55,15)	47,48 (41,98; 55,64)	0,779
12. hafta	50,08 (48,91; 51,13)	44,25 (38,49; 49,79)	50,23 (44,81; 56,01)	0,397
13. hafta	49,40 (47,83; 50,98)	51,90 (45,35; 67,83)	48,15 (45,63; 59,08)	0,701

*Kruskal-Wallis H Testi *Bonferroni düzeltmesi *p<0,05



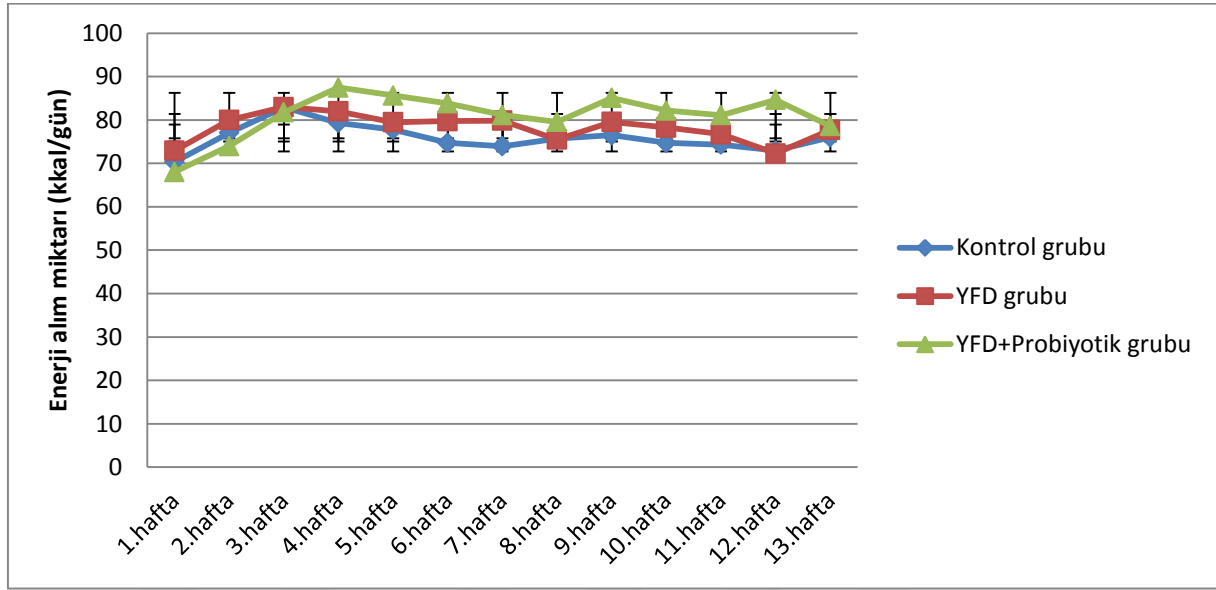
Şekil 4.2. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre su tüketim miktarları (mL/gün)

Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre günlük ortalama enerji alım miktarlarının M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. Kontrol grubunun 1. haftada minimum (70,35 kkal/gün) ve 3. haftada maksimum (82,90 kkal/gün); YFD grubunun 12. haftada minimum (72,30 kkal/gün) ve 3. haftada maksimum (83,00 kkal/gün); YFD+probiyotik grubunun 1. haftada minimum (68,60 kkal/gün) ve 4. haftada maksimum (87,48 kkal/gün) enerji aldıkları saptanmıştır. 12. haftada YFD+probiyotik grubunun enerji alımı (kkal) diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.3. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre günlük ortalama enerji alım miktarları (kkal/gün)

	Kontrol^a	YFD^b	YFD+Probiyotik^c	p
	M (Q1; Q3)	M (Q1; Q3)	M (Q1; Q3)	
1. hafta	70,35 (65,41; 74,58)	72,90 (61,64; 73,51)	68,60 (64,96; 74,64)	0,926
2. hafta	77,03 (74,73; 82,25)	80,00 (72,26; 85,34)	74,00 (72,14; 80,66)	0,584
3. hafta	82,90 (77,60; 87,79)	83,00 (78,34; 85,49)	81,75 (77,81; 85,50)	0,944
4. hafta	79,33 (77,46; 81,75)	82,00 (75,51; 86,31)	87,48 (79,21; 92,40)	0,437
5. hafta	77,78 (76,78; 78,89)	79,48 (67,53; 87,41)	85,65 (80,59; 95,40)	0,116
6. hafta	74,73 (73,41; 76,49)	79,73 (71,36; 89,40)	83,83 (82,18; 90,91)	0,199
7. hafta	73,93 (72,48; 75,98)	79,83 (71,79; 86,48)	81,13 (79,68; 90,08)	0,118
8. hafta	75,68 (73,14; 76,49)	75,50 (66,31; 87,99)	79,55 (74,65; 115,61)	0,472
9. hafta	76,50 (74,98; 78,51)	79,55 (70,50; 87,63)	85,08 (81,38; 89,53)	0,155
10. hafta	74,73 (74,46; 76,60)	78,25 (69,14; 87,96)	82,18 (74,00; 91,85)	0,584
11. hafta	74,33 (73,84; 76,31)	76,73 (71,70; 85,50)	81,10 (78,56; 94,59)	0,155
12. hafta	72,97 (72,71; 73,35)	72,30 (42,98; 80,89)	84,63 (81,21; 93,55) ^{ab}	0,039*
13. hafta	76,00 (74,45; 77,96)	77,70 (74,44; 87,45)	78,58 (73,44; 92,19)	0,874

*Kruskal-Wallis H Testi *Bonferroni düzeltmesi * $p<0,05$



Şekil 4.3. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre günlük ortalama enerji alımları (kcal/gün)

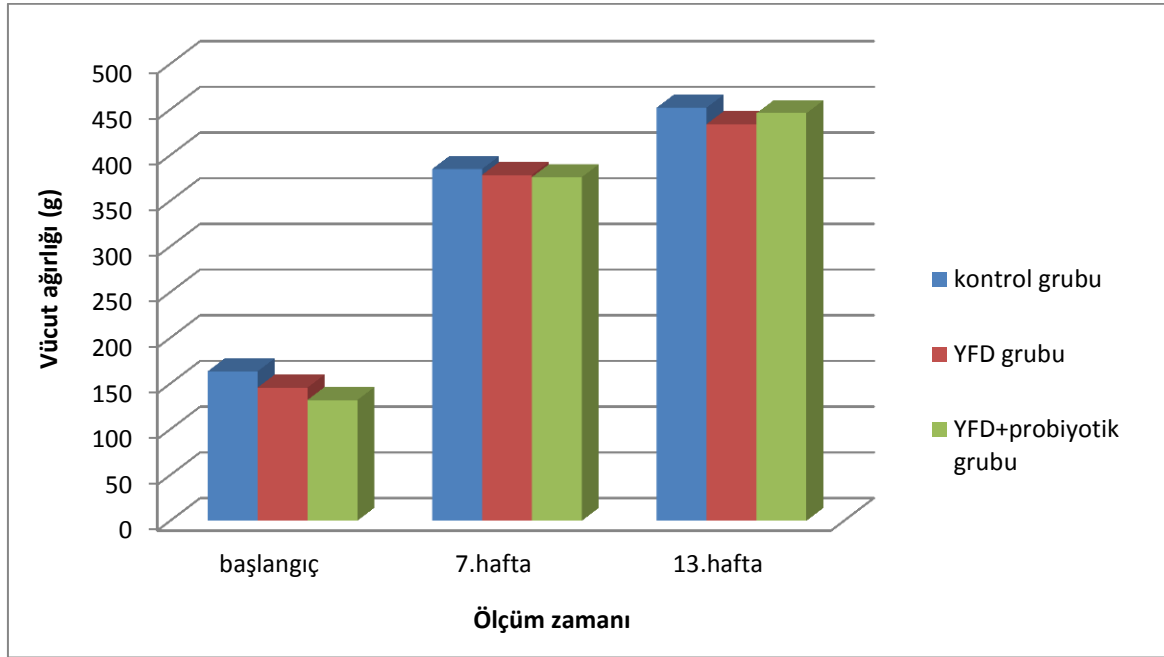
4.2. Sıçanların Vücut Ağırlıklarındaki ve Boy Uzunluklarındaki Değişimler

Sıçanların deneyin başı, ortası ve sonundaki vücut ağırlıklarının M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.4. ve Şekil 4.4'te belirtilmiştir. Gruplar arası vücut ağırlıklarında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$). Tüm gruplarda başlangıca göre deney sonundaki vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.4. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre deneyin başlangıcı, 7.hafta ve 13.hafta vücut ağırlıkları (g)

Vücut Ağırlığı	Kontrol Grubu M (Q1; Q3)	YFD Grubu M (Q1; Q3)	YFD+Probiyotik Grubu M (Q1; Q3)	p
Başlangıç¹	169,00 (148,25; 174,00)	150,00 (137,75; 159,50)	131,50 (117,00; 155,00)	0,135
7.hafta²	380,50 (368,25; 412,75)	386,50 (327,75; 414,00)	379,50 (328,75; 412,50)	1,000
13.hafta³	448,00 (421,50; 485,00) ¹	440,00 (381,75; 474,75) ¹	444,00 (389,50; 491,00) ¹	1,000
p	0,001*	0,000*	0,000*	

*Kruskal-Wallis H Testi *Friedman testi * $p<0,05$



Şekil 4.4. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre deneyin başlangıcı, 7.hafta ve 13.hafta vücut ağırlıkları (g)

Sıçanların vücut ağırlığı yüzde değişimlerinin M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5’da verilmiştir. Vücut ağırlığı değişimi 1 ve 3 hesaplamaları ile kontrol grubuna göre YFD+probiyotik grubu anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Ağırlık değişim yüzdesi 3; tüm gruplarda ağırlık değişim yüzdesi 2’ye oranla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.5. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre vücut ağırlığı değişimleri (%)

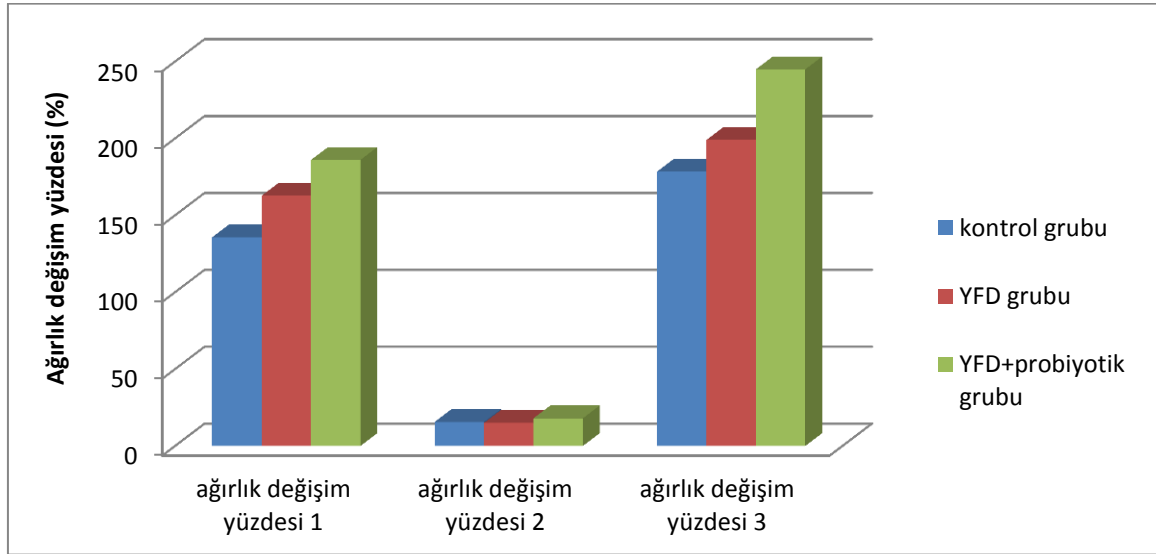
Vücut Ağırlığı	Kontrol Grubu ^a M (Q1; Q3)	YFD Grubu ^b M (Q1; Q3)	YFD+Probiyotik Grubu ^c M (Q1; Q3)	p
Ağırlık değişimi 1 (%) ¹	135,71 (124,02; 140,99)	162,68 (144,29; 170,39)	185,95 (168,71; 203,70) ^a	0,02*
Ağırlık değişimi 2 (%) ²	15,61 (15,61; 27,42)	14,97 (11,35; 18,27)	18,04 (15,94; 20,37)	0,251
Ağırlık değişimi 3 (%) ³	178,42 (145,35; 203,55) ²	198,99 (170,10; 217,54) ²	244,85 (214,53; 255,72) ^{a,2}	0,011*
p	0,001*	0,000*	0,000*	

*Kruskal-Wallis H Testi

*Bonferroni düzeltmesi

*Friedman testi

* $p<0,05$



Şekil 4.5. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre vücut ağırlığı değişimleri (%)

Sıçanların deneyin başı, ortası ve sonundaki boy uzunluklarının M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.7’de belirtilmiştir. Kontrol grubunun başlangıç boy uzunluğu YFD+probiyotik grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol grubundaki sıçanların kesimdeki boy uzunluğu (24,20 cm) YFD (23,00 cm) ve YFD+probiyotik grubundan (23,75 cm) anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Tüm gruplarda başlangıca göre kesimdeki boy uzunluklarında ve YFD grubunda başlangıca göre 7. hafta boy uzunluğunda anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.6. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre deneyin başlangıcı, 7.hafta ve 13.hafta boy uzunlukları (cm)

Boy uzunluğu	Kontrol Grubu ^a M (Q1; Q3)	YFD Grubu ^b M (Q1; Q3)	YFD+Probiyotik Grubu ^c M (Q1; Q3)	p
Başlangıç boy uzunluğu ¹	17,00 (16,50; 18,50)	16,00 (15,63; 16,23) ^a	15,75 (15,50; 16,00) ^a	0,005*
7.hafta boy uzunluğu ²	23,75 (22,63; 24,00)	23,00 (21,75; 23,50) ¹	23,00 (23,00; 23,00)	0,118
Kesim boy uzunluğu ³	24,20 (24,00; 24,20) ¹	23,00 (22,50; 23,50) ^{a,1}	23,75 (23,00; 24,00) ^{a,1}	0,011*
p	0,000*	0,001*	0,001*	

*Kruskal-Wallis H Testi

*Bonferroni düzeltmesi

*Friedman testi

Sıçanların boy uzunluğu yüzde değişimlerinin M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Boy uzunluğu değişimi 1, 2 ve 3 formülleri sonucu çıkan yüzde değişimler gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). Boy uzunluğu değişim

yüzdesi 3; tüm gruplarda boy uzunluğu değişim yüzdesi 2'ye oranla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). YFD grubunda boy uzunluğu değişim yüzdesi 2; boy uzunluğu değişim yüzdesi 1'e oranla anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.7. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre boy uzunluğu değişimleri (%)

Vücut Ağırlığı	Kontrol Grubu M (Q1; Q3)	YFD Grubu M (Q1; Q3)	YFD+Probiyotik Grubu M (Q1; Q3)	p
Boy uzunluğu değişimi 1 (%) ¹	38,24 (25,40; 44,70)	41,14 (40,16; 46,10)	48,39 (40,49; 49,60)	0,223
Boy uzunluğu değişimi 2 (%) ²	1,91 (0,83; 6,90)	2,20 (0,00; 4,53) ¹	3,27 (0,00; 4,35)	1,000
Boy uzunluğu değişimi 3 (%) ³	44,51 (27,60; 46,96) ²	44,67 (43,75; 46,83) ²	49,20 (44,18; 54,84) ²	0,607
p	0,000*	0,001*	0,001*	

*Kruskal-Wallis H Testi

*Friedman testi

* $p<0,05$

4.3. Sıçanların Beden Kütle İndeksleri, Lee İndeksleri ve Bel Çevrelerindeki Değişimler

Sıçanların deney başlangıcında, deneyin 7. haftasında ve 13.haftasında gruplar arası antropometrik ölçümlerinin M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.8.'de belirtilmiştir. Tüm ölçümlerde sıçanların BKİ, Lee indeksi ve bel çevresi ölçümleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p<0,05$).

Çizelge 4.8. Sıçanların deney başlangıcında, deneyin 7.haftasında ve deney 13.haftasında gruplar arası antropometrik ölçümlerinin değerlendirilmesi

	Kontrol M (Q1; Q3)	YFD M (Q1; Q3)	YFD+Probiyotik M (Q1; Q3)	p
Deney başlangıcı				
BKİ (g/cm ²)	0,58 (0,48; 0,62)	0,60 (0,56; 0,62)	0,54 (0,49; 0,58)	0,223
Lee indeksi (³ √g/cm)	0,33 (0,30; 0,34)	0,33 (0,33; 0,34)	0,33 (0,32; 0,33)	0,607
Bel çevresi (cm)	14,05 (13,33; 14,20)	13,40 (12,73; 13,58)	13,10 (13,00; 13,48)	0,113
Deneyin 7.haftası				
BKİ (g/cm ²)	0,71 (0,65; 0,73)	0,78 (0,61; 0,83)	0,70 (0,62; 0,81)	0,113
Lee indeksi (³ √g/cm)	0,31 (0,30; 0,32)	0,32 (0,30; 0,34)	0,31 (0,30; 0,33)	0,223
Bel çevresi (cm)	17,00 (16,25; 18,50)	17,00 (15,25; 17,38)	17,50 (16,25; 18,00)	0,472

*Kruskal-Wallis H Testi

* $p<0,05$

Çizelge 4.8. (devam) Sıçanların deney başlangıcında, deneyin 7.haftasında ve deney 13.haftasında gruplar arası antropometrik ölçümlerinin değerlendirilmesi

	Kontrol M (Q1; Q3)	YFD M (Q1; Q3)	YFD+Probiyotik M (Q1; Q3)	p
Deney 13.haftası				
BKİ (g/cm ²)	0,76 (0,72; 0,83)	0,83 (0,74; 0,89)	0,80 (0,72; 0,89)	0,607
Lee indeksi (³ √g/cm)	0,31 (0,31; 0,33)	0,33 (0,32; 0,34)	0,32 (0,31; 0,34)	0,607
Bel çevresi (cm)	17,90 (17,25; 18,65)	18,50 (17,50; 19,65)	17,85 (16,60; 18,85)	0,607

*Kruskal-Wallis H Testi *p<0,05

4.4. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Sıvı ve Yem Tüketimi ile Lee İndeksi ve Bel Çevresi Arasındaki Korelasyon

Sıçanların sıvı ve yem tüketimleri, lee indeksleri ve bel çevreleri arasındaki ilişki Çizelge 4.9’da belirtilmiştir. Son haftada yapılan ölçümler ile değerlendirilen Lee indeksi ve bel çevresi ile yem tüketimi ve enerji alımı arasında korelasyon gözlenmemiştir.

Çizelge 4.9. Sıçanların sıvı ve yem tüketimleri, lee indeksleri ve bel çevreleri arasındaki ilişki

Değişken	Yem tüketimi		Enerji alımı		Lee İndeksi		Bel Çevresi	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Yem tüketimi (g)	1,000	-	0,119	0,713	0,140	0,665	-0,287	0,365
Enerji alımı (kkal)	0,119	0,713	1,000	-	0,245	0,443	-0,266	0,403
Lee indeksi (³ √g/cm)	0,140	0,665	0,245	0,443	1,000	-	0,178	0,406
Bel çevresi (cm)	-0,287	0,365	-0,266	0,403	0,178	0,406	1,000	-

*Spearman korelasyon testi *p<0,05

4.5. Sıçanların Karaciğer Ağırlıklarındaki Değişimler

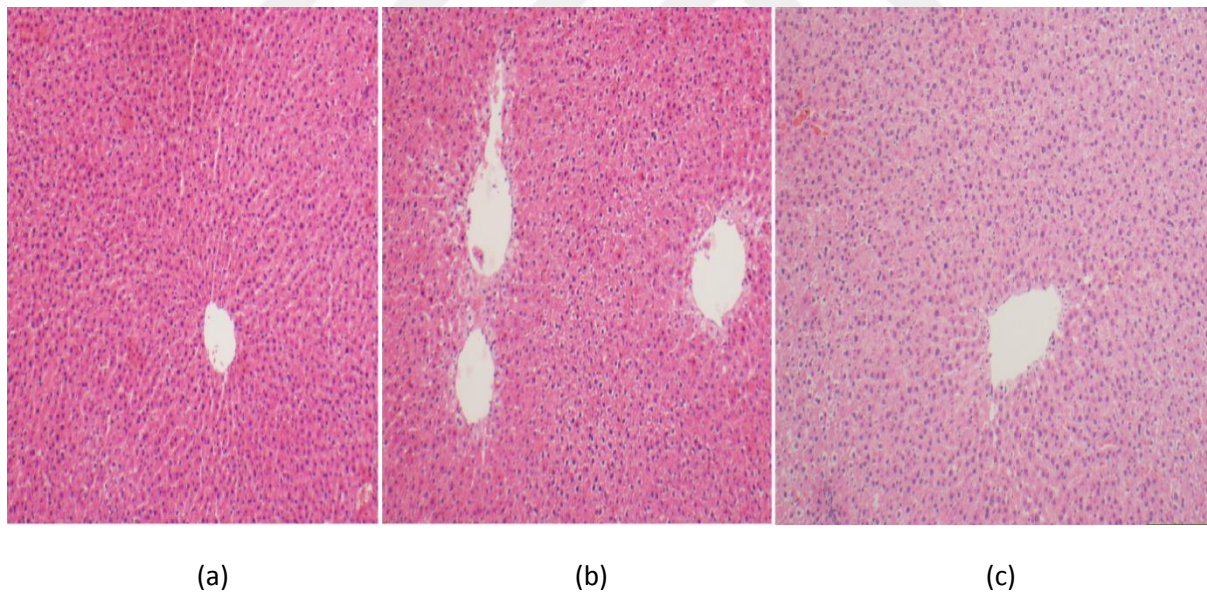
Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre karaciğer ağırlıkları ve karaciğer indekslerinin M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.10’da belirtilmiştir. Karaciğer ağırlığı kontrol grubu (11,21 g), YFD grubu (15,26 g) ve YFD+probiyotik grubu (12,30 g) arasında anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05). Kontrol grubunun karaciğer indeksi değeri (%2,51) YFD grubundan (%3,53) anlamlı olarak düşük çıkmıştır (p<0,05).

Çizelge 4.10. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre karaciğer ağırlıkları ve karaciğer indekslerinin değerlendirilmesi

Değişken	Kontrol Grubu ^a M (Q1; Q3)	YFD Grubu ^b M (Q1; Q3)	YFD+Probiyotik Grubu ^c M (Q1; Q3)	p
Karaciğer ağırlığı	11,21 (9,76; 12,36)	15,26 (12,12; 17,51)	12,30 (11,63; 15,30)	0,135
Karaciğer indeksi (%)	2,51 (2,18; 2,81)	3,53 (3,30; 3,74) ^a	3,01 (2,53; 3,35)	0,002*
*Kruskal-Wallis H Testi	*Bonferroni düzeltmesi	*p<0,05		

4.6. Histopatolojik Değerlendirme

Kontrol grubu, YFD grubu ve YFD+probiyotik grubu sıçan karaciğerlerinin histolojik görünüşleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğerinde sağlıklı hücre görünümü saptanmıştır. YFD grubunun sıçan karaciğerinde santral ven etrafında belirgin bir yağlanma gözlenmektedir. YFD+probiyotik grubunun sıçan karaciğerinde ise santral ven etrafında yağlanmada azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.6. Kontrol grubu (a), YFD grubu (b) ve YFD+probiyotik grubu (c) sıçan karaciğerlerinin histolojik görünüşleri (HEX200)

Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre karaciğer dokusu yağlanma düzeylerinin M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.11'de belirtilmiştir. YFD grubu (2) ve YFD+probiyotik (1) grubunun steatoz durumu kontrol grubundan (0) anlamlı olarak yüksek çıkmıştır ($p>0,05$). Kontrol grubu (0), YFD grubu (1) ve YFD+probiyotik grubunun (1) lobular inflamasyon skorlaması gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$). YFD grubunun

hepatoselüler balonlaşma skoru (2) kontrol grubu (0) ve YFD+probiyotik grubundan (1) anlamlı olarak yüksek çıkmıştır ($p<0,05$). YFD grubunun NAS skoru (5) kontrol grubu (0) ve YFD+probiyotik grubundan (3) anlamlı olarak yüksek çıkmıştır ($p<0,05$). Kontrol grubunun NAS skoru (0), YFD+probiyotik grubundan (3) anlamlı olarak düşük çıkmıştır ($p<0,05$).

Çizelge 4.11. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre karaciğer dokusu yağlanma düzeyleri

Değişken	Kontrol Grubu ^a M (Q1; Q3)	YFD Grubu ^b M (Q1; Q3)	YFD+Probiyotik Grubu ^c M (Q1; Q3)	p
Steatoz (0-3)	0,00 (0,00; 0,00)	2,00 (2,00; 2,00) ^a	1,00 (1,00; 1,00) ^a	0,000*
Lobular İnflamasyon (0-3)	0,00 (0,00; 0,75)	1,00 (1,00; 1,00)	1,00 (0,00; 1,00)	0,113
Hepatoselüler Balonlaşma (0-2)	0,00 (0,00; 0,75)	2,00 (1,25; 2,00) ^a	1,00 (1,00; 1,00) ^b	0,000*
NAS (0-8)	0,00 (0,00; 1,50)	5,00 (4,25; 5,75) ^a	3,00 (2,00; 3,00) ^{a,b}	0,000*

*Kruskal-Wallis H Testi

*Bonferroni düzeltmesi

* $p<0,05$

4.7. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Biyokimyasal Bulguları

Sıçanların gruplara göre biyokimyasal parametrelerinin M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.12’de belirtilmiştir. Kontrol grubunun kan glikoz düzeyi (123,00 mg/dL) YFD grubundan (164,00 mg/dL) anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0,05$). YFD+probiyotik grubunun (44,00 mg/dL) total kolesterol değeri kontrol grubundan (62,50 mg/dL) anlamlı olarak düşüktür ($p<0,05$). AST değerlerinde kontrol grubu (233,00 U/L), YFD grubu (186,00 U/L) ve YFD+probiyotik grubu (167,00 U/L) arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). ALT değerlerinde kontrol grubu (63,50 U/L), YFD grubu (65,00 U/L) ve YFD+probiyotik grubu (60,50 U/L) arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). GGT değerlerinde kontrol grubu (4,50 U/L), YFD grubu (6,00 U/L) ve YFD+probiyotik grubu (3,50 U/L) arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Çizelge 4.12. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre biyokimyasal parametre düzeyleri

Değişken	Kontrol Grubu ^a M (Q1; Q3)	YFD Grubu ^b M (Q1; Q3)	YFD+Probiyotik Grubu ^c M (Q1; Q3)	p
Glikoz (mg/dL)	123,00 (109,50; 147,00)	164,00 (155,50;173,00) ^a	142,00 (124,75; 168,75)	0,009*
Total Kol. (mg/dL)	62,50 (59,25; 67,50)	51,50 (47,00; 61,50)	44,00 (40,50; 57,50) ^a	0,03*
AST (U/L)	233,00 (177,75; 286,00)	186,00 (118,00; 218,25)	167,00 (147,75; 183,50)	0,135
ALT (U/L)	63,50 (59,00; 74,50)	65,00 (45,50; 87,50)	60,50 (55,25; 72,00)	0,607
GGT (U/L)	4,50 (2,25; 5,75)	6,00 (2,25; 9,50)	3,50 (2,25; 4,75)	0,309

*Kruskal-Wallis H Testi *Bonferroni düzeltmesi *p<0,05

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, GGT: Gama glutamil transferaz

4.8. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre İnflamatuar Belirteç ve Hormon Düzeyleri

Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre inflammatuar belirteç ve hormon düzeylerinin M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.13'te belirtilmiştir. IL-6 değerlerinde kontrol grubu (2,30 ng/L), YFD grubu (2,35 ng/L) ve YFD+probiyotik grubu (2,60 ng/L) arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (p>0,05). IL-1 β değerlerinde kontrol grubu (55,23 pg/mL), YFD grubu (55,66 pg/mL) ve YFD+probiyotik grubu (58,48 pg/mL) arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (p>0,05). YFD+probiyotik grubunun melatonin düzeyi (386,34 pg/mL) kontrol grubu (477,37 pg/mL) ve YFD grubundan (443,30 pg/mL) anlamlı olarak düşük çıkmıştır (p<0,05). İnsülin değerlerinde kontrol grubu (97,75 pg/mL), YFD grubu (100,19 pg/mL) ve YFD+probiyotik grubu (110,86 pg/mL) arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (p>0,05).

Çizelge 4.13. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre inflammatuar belirteç ve hormon düzeyleri

Değişken	Kontrol Grubu ^a M (Q1; Q3)	YFD Grubu ^b M(Q1; Q3)	YFD+Probiyotik Grubu ^c M (Q1; Q3)	p
IL-6 (ng/L)	2,30 (2,14; 2,51)	2,35 (2,01; 2,72)	2,60 (2,25; 2,75)	0,135
IL-1 β (pg/mL)	55,23 (54,72; 56,48)	55,66 (55,19; 58,95)	58,48 (56,13; 62,14)	0,202
Melatonin (pg/mL)	477,37 (459,31; 507,96)	443,30 (400,08; 497,44)	386,34 (332,28; 391,92) ^{a,b}	0,002*
İnsülin (pg/mL)	97,75 (75,87; 119,77)	100,19 (86,98; 114,06)	110,86 (103,39; 113,62)	0,223

*Kruskal-Wallis H Testi *Bonferroni düzeltmesi *p<0,05 . IL-6: interlekin 6, IL-1 β : interlekin 1 β

4.9. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Serum Zonulin Düzeyleri

Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre zonulin ($\mu\text{g/mL}$) düzeylerinin M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.14'te belirtilmiştir. Zonulin seviyesi için kontrol grubu (55,23 $\mu\text{g/mL}$), YFD grubu (55,66 $\mu\text{g/mL}$) ve YFD+probiyotik grubu (58,48 $\mu\text{g/mL}$) arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Çizelge 4.14. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre zonulin düzeyleri

Değişken	Kontrol Grubu M (Q1; Q3)	YFD Grubu M (Q1; Q3)	YFD+Probiyotik Grubu M (Q1; Q3)	p
Zonulin ($\mu\text{g/mL}$)	55,23 (52,27; 56,96)	53,41 (45,05; 61,60)	59,55 (52,25; 67,57)	0,135

*Kruskal-Wallis H Testi * $p<0,05$

4.10. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Oksidatif Stres ve Antioksidan Enzim Düzeyleri

Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre oksidatif stres parametrelerinin düzeylerinin M, Q1 ve Q3 değerleri Çizelge 4.15'te belirtilmiştir. Kontrol grubunun MDA değeri (5,56 nmol/mL), YFD (8,49 nmol/mL) ve YFD+probiyotik grubundan (8,29 nmol/mL) anlamlı olarak düşük çıkmıştır ($p<0,09$). GSH değeri kontrol grubu (6,48 mg/mL), YFD grubu (7,56 mg/mL) ve YFD+probiyotik grubu (9,47 mg/mL) arasında anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Kontrol grubunun GSSG değeri (2,29 mg/mL), YFD (4,12 mg/mL) ve YFD+probiyotik grubundan (3,79 mg/mL) anlamlı olarak düşük çıkmıştır ($p<0,09$). GSH/GSSG oranı kontrol grubu (3,06), YFD grubu (2,02) ve YFD+probiyotik grubu (2,45) arasında anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). SOD değerleri kontrol grubu (197,50 U/mL), YFD grubu (185,50 U/mL) ve YFD+probiyotik grubu (205,50 U/mL) arasında anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Kontrol grubunun GPx değeri (509,50 U/mL) YFD grubundan (529,50 mL) anlamlı olarak düşük çıkmıştır ($p<0,05$).

Çizelge 4.15. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre oksidatif stres parametrelerinin düzeyleri

Değişken	Kontrol Grubu ^a M (Q1; Q3)	YFD Grubu ^b M (Q1; Q3)	YFD+Probiyotik Grubu ^c M (Q1; Q3)	p
MDA (nmol/mL)	5,56 (5,04; 7,34)	8,49 (7,57; 9,63) ^a	8,29 (7,23; 9,22) ^a	0,03*
GSH (mg/mL)	6,48 (5,29; 8,67)	7,56 (7,09; 8,44)	9,47 (8,27; 11,47)	0,153
GSSG (mg/mL)	2,29 (1,48; 2,81)	4,12 (3,06; 5,29) ^a	3,79 (2,76; 5,12) ^a	0,09*
GSH/GSSG	3,06 (2,23; 4,39)	2,02 (1,34; 2,73)	2,45 (2,05; 3,46)	0,197
SOD (U/mL)	197,50 (187,50; 205,25)	185,50 (170,25; 208,75)	205,50 (185,00; 216,75)	0,223
GPx (U/mL)	509,50 (485,75; 518,25)	529,50 (524,00; 536,00) ^a	530,00 (516,00; 543,00)	0,03*

*Kruskal-Wallis H Testi *Bonferroni düzeltmesi *p<0,05

GSH: Redükte glutatyon, GSSG: Okside glutatyon, MDA: Malondialdehit, GPx: Glutatyon peroksidaz, SOD: Süperoksit dismutaz

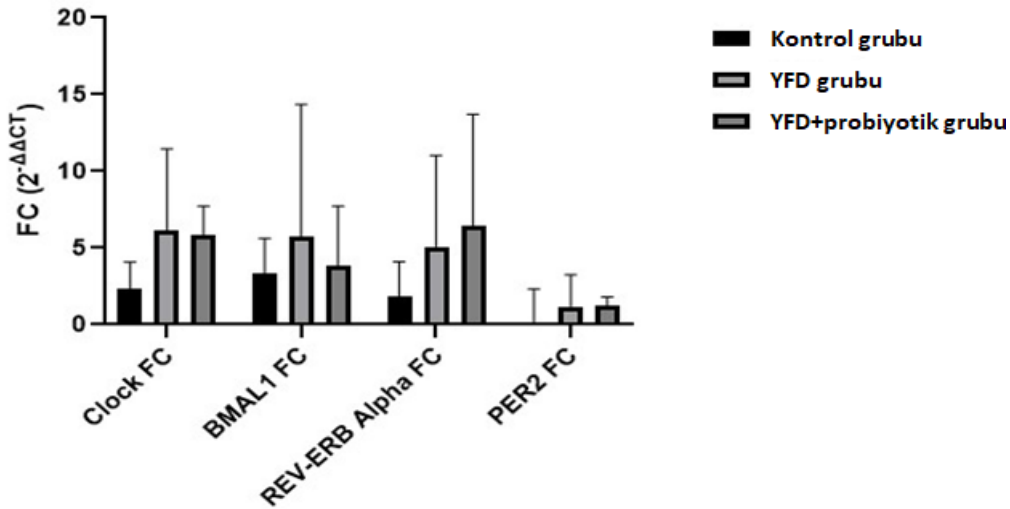
4.11. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Sirkadiyen Saat Gen Düzeyleri

Sıçanların gruplara göre gen ekspresyon düzeyleri Çizelge 4.16 ve Şekil 4.7’de verilmiştir. Clock, Bmal1, Rev-erbα ve Per2 genleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir (p>0,05).

Çizelge 4.16. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Clock, Bmal1, Rev-Erbα ve Per2 gen ekspresyon düzeyleri

Değişken	Kontrol Grubu $\bar{x} \pm SS$	YFD Grubu $\bar{x} \pm SS$	YFD+Probiyotik Grubu $\bar{x} \pm SS$	p
Clock FC (2 ^{ΔΔCT})	2,32 ± 1,76	6,12 ± 5,34	5,86 ± 1,87	0,068
Bmal1 FC (2 ^{ΔΔCT})	3,31 ± 2,34	5,71 ± 8,65	3,81 ± 3,91	0,672
Rev-Erbα FC (2 ^{ΔΔCT})	1,86 ± 2,25	5,09 ± 5,94	6,46 ± 7,25	0,259
Per2 FC (2 ^{ΔΔCT})	2,05 ± 2,32	4,64 ± 5,08	2,54 ± 0,90	0,265

*One-Way Anova *p<0,05



Şekil 4.7. Genlerin gruplar arası Katsayı Değişim (Fold Change, FC) grafiği

4.12. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Serum Zonulin Düzeyi ile İnflamatuar Belirteçler, Hormon Düzeyleri, Biyokimyasal Bulgular, Lee İndeksi, Antioksidan Durum ve Sirkadiyen Gen Düzeyleri Arasındaki İlişki

Sıçanların gruplara göre zonulin düzeyi ile inflammatuar belirteçler, hormon düzeyleri, biyokimyasal parametreler, Lee İndeksi, oksidatif stres düzeyleri ve sirkadiyen saat genleri arasındaki korelasyon Çizelge 4.17’de belirtilmiştir. Kontrol grubunun zonulin düzeyi ile melatonin seviyesi arasında negatif yönlü ($r=-0,762$; $p=0,028$), AST ($r=0,881$; $p=0,004$) ve ALT ($r=0,814$; $p=0,014$) düzeyi ile pozitif yönlü korelasyon bulunmuştur. YFD+probiyotik grubunun zonulin düzeyi ile sıçanların kesiminde elde edilen lee indeksi arasında pozitif yönlü bir korelasyon ($r=0,833$; $p=0,010$) bulunmuştur. Zonulin seviyesi ile Bmal1 gen seviyesi ($r=-0,435$; $p=0,034$) ve YFD grubunun Bmal1 gen seviyesi ($r=-0,762$; $p=0,028$) arasında negatif yönlü bir korelasyon gözlenmiştir. Gruplar arasında ve diyet müdahale grupları toplam olarak değerlendirildiğinde zonulin düzeyi IL-6, IL-1 β , insülin, glikoz, total kolesterol, GGT, GSH, GSSG, SOD, MDA, GPx, Clock, Rev-Erba ve Per2 değerleri ile korelasyon gözlenmemiştir.

Çizelge 4.17. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre serum zonulin düzeyi ile inflamatuvar belirteçler, hormon düzeyleri, biyokimyasal parametreler, Lee İndeksi, oksidatif stres düzeyleri ve sirkadiyen saat genlerinin ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki

Değişken	Kontrol Grubu		YFD Grubu		YFD+Probiyotik Grubu		Toplam	
	r	P	r	p	r	p	r	p
IL-6 (ng/L)	0,333	0,420	0,571	0,139	-0,156	0,713	0,340	0,104
IL-1 β (pg/mL)	-0,072	0,866	-0,386	0,346	0,275	0,509	0,023	0,915
Melatonin (pg/mL)	-0,762	0,028*	0,119	0,779	0,168	0,691	-0,050	0,815
İnsülin (pg/mL)	0,524	0,183	0,167	0,693	0,048	0,911	0,242	0,255
Glikoz (mg/dL)	0,443	0,272	-0,084	0,844	0,216	0,608	0,025	0,908
Total Kolesterol (mg/dL)	0,571	0,139	0,381	0,352	-0,452	0,260	-0,104	0,627
AST (U/L)	0,881	0,004*	0,048	0,911	-0,119	0,779	-0,103	0,633
ALT (U/L)	0,814	0,014*	-0,024	0,955	-0,405	0,320	-0,081	0,708
GGT (U/L)	-0,265	0,526	-0,119	0,779	0,073	0,864	0,204	0,338
Lee İndeksi ($^3\sqrt{\text{g/cm}}$)	-0,048	0,911	-0,357	0,385	0,833	0,010*	0,068	0,753
GSH (mg/mL)	0,286	0,535	0,524	0,183	-0,238	0,570	0,274	0,206
GSSG (mg/mL)	-0,321	0,482	-0,071	0,867	-0,238	0,570	-0,133	0,544
SOD (U/mL)	0,476	0,233	0,252	0,548	-0,690	0,058	-0,003	0,990
MDA (nmol/mL)	0,190	0,651	-0,071	0,867	0,024	0,955	0,179	0,402
GPx (U/mL)	0,405	0,320	-0,169	0,690	-0,214	0,610	0,070	0,746
Clock ($2^{\Delta\Delta\text{CT}}$)	0,119	0,779	-0,667	0,071	-0,190	0,651	-0,163	0,448
Bmal1 ($2^{\Delta\Delta\text{CT}}$)	0,214	0,610	-0,762	0,028*	-0,476	0,233	-0,435	0,034*
Rev-Erb α ($2^{\Delta\Delta\text{CT}}$)	-0,452	0,260	-0,357	0,385	0,024	0,955	-0,116	0,590
Per2 ($2^{\Delta\Delta\text{CT}}$)	-0,071	0,867	-0,119	0,779	-0,333	0,420	-0,102	0,636

*Spearman korelasyon testi *p<0,05

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, GGT: Gama glutamil transferaz IL-6: interleukin 6, IL-1 β : interleukin 1 β , GSH: Redükte glutatyon, GSSG: Okside glutatyon, MDA: Malondialdehit, GPx: Glutatyon peroksidaz, SOD: Süperoksit dismutaz

4.13. Sıçanların Sirkadiyen Saat Gen Ekspresyon Seviyeleri ile Karaciğer Organ Ağırlığı, Lee İndeksi, Oksidatif Stres Durumu, Biyokimyasal Bulgular, İnflamatuvar Belirteçler ve Hormon Değerleri Arasındaki İlişki

Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Clock gen ekspresyon seviyesi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki korelasyon Çizelge 4.18’de verilmiştir. Lee indeksi YFD grubunda Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon ($r=0,714$; $p=0,047$) göstermiştir. GSH seviyesi YFD+probiyotik grubunda Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon ($r=0,714$; $p=0,047$) göstermiştir. GSSG seviyesi YFD+probiyotik grubu ($r=0,976$; $p=0,000$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=0,651$; $p=0,001$) Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon göstermiştir. Diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde GSH/GSSG oranı ($r=-0,420$; $p=0,046$), total kolesterol ($r=-0,408$; $p=0,048$) ve melatonin seviyesi ($r=-0,431$; $p=0,035$) Clock gen ekspresyon seviyesi ile negatif korelasyon göstermiştir. MDA seviyesi Clock gen ekspresyon seviyesi ile kontrol grubunda negatif korelasyon ($r=-0,762$; $p=0,028$), YFD+probiyotik ($r=0,786$; $p=0,021$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=0,534$; $p=0,007$) pozitif korelasyon göstermiştir. GPx seviyesi YFD+probiyotik grubunda Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon ($r=0,738$; $p=0,037$) göstermiştir. IL-6 seviyesi kontrol grubu ($r=0,810$; $p=0,015$) ve YFD+probiyotik ($r=0,826$; $p=0,011$) grubunda Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon göstermiştir. IL-1 β seviyesi Clock gen ekspresyon seviyesi ile kontrol grubu ($r=0,743$; $p=0,035$), YFD+probiyotik ($r=0,731$; $p=0,040$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=0,618$; $p=0,001$) pozitif korelasyon göstermiştir.

Çizelge 4.18. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Clock gen ekspresyon seviyesi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki ilişki

Değişken	Kontrol Grubu		YFD Grubu		YFD+Probiyotik Grubu		Toplam	
	r	P	r	p	r	p	r	p
Karaciğer organ ağırlığı (g)	0,238	0,570	-0,310	0,456	-0,071	0,867	0,185	0,386
Lee indeksi ($^3\sqrt{\text{g/cm}}$)	0,429	0,289	0,714	0,047*	-0,095	0,823	0,390	0,059
GSH (mg/mL)	0,214	0,645	-0,095	0,823	0,714	0,047*	0,398	0,060
GSSG (mg/mL)	0,143	0,760	0,595	0,120	0,976	0,000*	0,651	0,001*
GSH/GSSG	-0,214	0,645	-0,429	0,289	-0,548	0,160	-0,420	0,046*
SOD (U/mL)	0,381	0,352	0,012	0,978	0,405	0,320	0,106	0,623
MDA (nmol/mL)	-0,762	0,028*	0,452	0,260	0,786	0,021*	0,534	0,007*
GPx (U/mL)	0,048	0,911	0,000	1,000	0,738	0,037*	0,335	0,109
Glikoz (mg/dL)	0,072	0,866	0,024	0,955	-0,563	0,146	0,127	0,554
Total Kolesterol (mg/dL)	-0,214	0,610	-0,071	0,867	0,190	0,651	-0,408	0,048*
AST (U/L)	-0,024	0,955	-0,190	0,651	0,071	0,867	-0,366	0,079
ALT (U/L)	0,299	0,471	-0,095	0,823	0,286	0,493	-0,013	0,950
GGT (U/L)	0,386	0,346	0,262	0,531	0,485	0,223	0,203	0,341
IL-6 (ng/L)	0,810	0,015*	-0,286	0,493	0,826	0,011*	0,322	0,126
IL-1 β (pg/mL)	0,743	0,035*	0,205	0,627	0,731	0,040*	0,618	0,001*
Melatonin (pg/mL)	0,024	0,955	0,000	1,000	-0,060	0,888	-0,431	0,035*
İnsülin (pg/mL)	-0,429	0,289	0,357	0,385	0,381	0,352	0,158	0,460

*Spearman korelasyon testi *p<0,05

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, GGT: Gama glutamil transferaz IL-6: interleukin 6, IL-1 β : interleukin 1 β , GSH: Redükte glutatyon, GSSG: Okside glutatyon, MDA: Malondialdehit, GPx: Glutatyon peroksidaz, SOD: Süperoksit dismutaz

Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Bmal1 gen ekspresyon seviyesi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki korelasyon Çizelge 4.19’da verilmiştir. GSSG (r=0,786; p=0,021), MDA (r=0,714; p=0,047), ALT (r=0,738; p=0,037) ve IL-6 (r=0,726; p=0,011) seviyesi Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon göstermiştir. GGT seviyesi diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon (r=0,495; p=0,014) göstermiştir.

Çizelge 4.19. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Bmal1 gen düzeyi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki ilişki

Değişken	Kontrol Grubu		YFD Grubu		YFD+Probiyotik Grubu		Toplam	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Karaciğer organ ağırlığı (g)	0,048	0,911	-0,238	0,570	-0,405	0,320	-0,220	0,302
Lee indeksi ($^3\sqrt{\text{g/cm}}$)	0,429	0,289	0,571	0,139	-0,262	0,531	0,267	0,207
GSH (mg/mL)	-0,214	0,645	-0,190	0,651	0,524	0,183	0,54	0,805
GSSG (mg/mL)	0,357	0,432	0,310	0,456	0,786	0,021*	0,281	0,195
GSH/GSSG	-0,536	0,215	-0,190	0,651	-0,524	0,183	-0,349	0,103
SOD (U/mL)	0,095	0,823	0,000	1,000	0,667	0,071	0,268	0,205
MDA (nmol/mL)	-0,548	0,160	0,476	0,233	0,714	0,047*	0,076	0,725
GPx (U/mL)	-0,238	0,570	-0,301	0,468	0,286	0,493	-0,097	0,653
Glikoz (mg/dL)	0,263	0,528	-0,311	0,453	-0,371	0,365	-0,164	0,444
Total Kolesterol (mg/dL)	-0,190	0,651	-0,167	0,693	0,405	0,320	-0,038	0,859
AST (U/L)	0,095	0,823	-0,381	0,352	0,071	0,867	-0,012	0,955
ALT (U/L)	0,383	0,349	-0,405	0,320	0,738	0,037*	0,119	0,579
GGT (U/L)	0,566	0,143	0,571	0,139	0,521	0,185	0,495	0,014*
IL-6 (ng/L)	0,548	0,160	-0,190	0,651	0,826	0,011*	0,260	0,220
IL-1 β (pg/mL)	0,575	0,136	0,482	0,227	0,359	0,382	0,336	0,108
Melatonin (pg/mL)	-0,190	0,651	0,310	0,456	-0,204	0,629	-0,097	0,654
İnsülin (pg/mL)	0,452	0,260	-0,071	0,867	-0,238	0,570	-0,228	0,284

*Spearman korelasyon testi *p<0,05

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, GGT: Gama glutamil transferaz IL-6: interleukin 6, IL-1 β : interleukin 1 β , GSH: Redükte glutatyon, GSSG: Okside glutatyon, MDA: Malondialdehit, GPx: Glutatyon peroksidaz, SOD: Süperoksit dismutaz

Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki korelasyon Çizelge 4.20’de verilmiştir. Melatonin seviyesi diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile negatif korelasyon ($r=-0,450$; $p=0,027$) göstermiştir. GSH/GSSG oranı YFD grubunda Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile negatif korelasyon ($r=-0,762$; $p=0,028$) göstermiştir. GSSG seviyesi Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile YFD grubunda ($r=0,786$; $p=0,021$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=0,443$; $p=0,034$) pozitif korelasyon göstermiştir. MDA seviyesi Rev-Erba gen

ekspresyon seviyesi ile kontrol grubunda negatif korelasyon ($r=-0,738$; $p=0,037$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde pozitif korelasyon ($r=0,433$; $p=0,035$) göstermiştir. Total kolesterol seviyesi Rev-Erb α gen ekspresyon seviyesi ile YFD+probiyotik grubunda ($r=-0,810$; $p=0,015$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=-0,447$; $p=0,029$) negatif korelasyon göstermiştir. AST seviyesi Rev-Erb α gen ekspresyon seviyesi ile YFD+probiyotik grubunda ($r=-0,929$; $p=0,001$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=-0,470$; $p=0,021$) negatif korelasyon göstermiştir. IL-1 β seviyesi Rev-Erb α gen ekspresyon seviyesi ile kontrol grubunda ($r=0,850$; $p=0,007$) pozitif korelasyon göstermiştir.

Çizelge 4.20. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Rev-Erb α gen düzeyi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki ilişki

Değişken	Kontrol Grubu		YFD Grubu		YFD+Probiyotik Grubu		Toplam	
	r	p	R	P	r	p	R	P
Karaciğer organ ağırlığı (g)	0,190	0,651	-0,286	0,493	0,000	1,000	0,117	0,585
Lee indeksi ($^3\sqrt{\text{g/cm}}$)	0,214	0,610	0,690	0,058	-0,190	0,651	0,257	0,225
GSH (mg/mL)	0,000	1,000	-0,214	0,610	-0,095	0,823	0,177	0,419
GSSG (mg/mL)	-0,143	0,760	0,786	0,021*	-0,095	0,823	0,443	0,034*
GSH/GSSG	-0,036	0,939	-0,762	0,028*	0,190	0,651	-0,305	0,157
SOD (U/mL)	0,024	0,955	0,180	0,670	0,143	0,736	0,101	0,638
MDA (nmol/mL)	-0,738	0,037*	0,429	0,289	0,333	0,420	0,433	0,035*
GPx (U/mL)	-0,119	0,779	0,072	0,865	-0,333	0,420	0,037	0,862
Glikoz (mg/dL)	0,096	0,821	-0,156	0,713	-0,120	0,778	0,019	0,931
Total Kolesterol (mg/dL)	-0,167	0,693	0,310	0,456	-0,810	0,015*	-0,447	0,029*
AST (U/L)	-0,333	0,420	-0,071	0,867	-0,929	0,001*	-0,470	0,021*
ALT (U/L)	-0,263	0,528	-0,119	0,779	0,024	0,955	-0,100	0,641
GGT (U/L)	0,265	0,526	0,476	0,233	0,339	0,411	0,348	0,096
IL-6 (ng/L)	0,429	0,289	-0,095	0,823	-0,252	0,548	0,111	0,607
IL-1 β (pg/mL)	0,850	0,007*	0,229	0,586	0,036	0,933	0,427	0,037*
Melatonin (pg/mL)	0,310	0,456	0,048	0,911	-0,647	0,083	-0,450	0,027*
İnsülin (pg/mL)	-0,286	0,493	0,571	0,139	-0,357	0,385	0,080	0,710

*Spearman korelasyon testi * $p<0,05$

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, GGT: Gama glutamil transferaz IL-6: interleukin 6, IL-1 β : interleukin 1 β , GSH: Redükte glutatyon, GSSG: Okside glutatyon, MDA: Malondialdehit, GPx: Glutatyon peroksidaz, SOD: Süperoksit dismutaz

Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Per2 gen ekspresyon seviyesi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki korelasyon Çizelge 4.21’de verilmiştir. GSSG seviyesi diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde Per2 gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon ($r=0,426$; $p=0,043$) göstermiştir. Melatonin seviyesi diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde Per2 gen ekspresyon seviyesi ile negatif korelasyon ($r=-0,410$; $p=0,047$) göstermiştir. İnsülin seviyesi YFD grubunda Per2 gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon ($r=0,762$; $p=0,028$) göstermiştir.

Çizelge 4.21. Sıçanların diyet müdahale gruplarına göre Per2 gen düzeyi ile karaciğer organ ağırlığı, Lee indeksi, oksidatif stres durumu, biyokimyasal bulgular, inflamatuvar belirteçler ve hormon değerleri arasındaki ilişki

Değişken	Kontrol Grubu		YFD Grubu		YFD+Probiyotik Grubu		Toplam	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Karaciğer organ ağırlığı (g)	-0,167	0,693	-0,429	0,289	-0,095	0,823	-0,055	0,799
Lee indeksi ($^3\sqrt{g/cm}$)	0,619	0,102	0,429	0,289	-0,524	0,183	0,235	0,269
GSH (mg/mL)	-0,071	0,879	0,095	0,823	0,143	0,736	0,116	0,599
GSSG (mg/mL)	0,179	0,702	0,690	0,058	0,214	0,610	0,426	0,043*
GSH/GSSG	-0,214	0,645	-0,643	0,086	-0,095	0,823	-0,345	0,107
SOD (U/mL)	0,143	0,736	0,263	0,528	-0,071	0,867	0,047	0,829
MDA (nmol/mL)	-0,262	0,531	0,214	0,610	0,024	0,955	0,210	0,326
GPx (U/mL)	0,048	0,911	0,157	0,711	0,452	0,260	0,224	0,292
Glikoz (mg/dL)	0,252	0,548	0,395	0,333	-0,563	0,146	0,191	0,370
Total Kolesterol (mg/dL)	0,071	0,867	0,214	0,610	-0,429	0,289	-0,220	0,302
AST (U/L)	-0,214	0,610	0,071	0,867	-0,333	0,420	-0,150	0,485
ALT (U/L)	0,275	0,509	0,286	0,493	-0,333	0,420	0,202	0,343
GGT (U/L)	0,349	0,396	-0,143	0,736	0,133	0,753	-0,025	0,908
IL-6 (ng/L)	0,619	0,102	-0,119	0,779	-0,144	0,734	0,161	0,451
IL-1 β (pg/mL)	0,539	0,168	0,060	0,887	0,323	0,435	0,320	0,128
Melatonin (pg/mL)	0,095	0,823	-0,238	0,570	-0,419	0,301	-0,410	0,047*
İnsülin (pg/mL)	-0,310	0,456	0,762	0,028*	0,619	0,102	0,283	0,181

*Spearman korelasyon testi * $p<0,05$

AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz, GGT: Gama glutamil transferaz IL-6: interleukin 6, IL-1 β : interleukin 1 β , GSH: Redükte glutatyon, GSSG: Okside glutatyon, MDA: Malondialdehit, GPx: Glutatyon peroksidaz, SOD: Süperoksit dismutaz



5. TARTIŞMA

Son yıllarda elde edilen kanıtlar, sirkadiyen ritimlerin bir dizi metabolik sürecin ve lipidler ve glikoz dahil olmak üzere birçok metabolitin ve kanda sirkadiyen bir şekilde salınan leptin ve insülin gibi bazı metabolizma ile ilgili hormonların düzenlenmesi yoluyla metabolik homeostaz ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır [520, 521]. Epidemiyolojik çalışmalar, sirkadiyen gelerin yanlış hizalanmasının, insan sağlığına ciddi tehditler olan hipertansiyon, insülin direnci ve obezite dahil olmak üzere çok çeşitli metabolik sendromlara katkıda bulunabileceğini göstermektedir [522]. Bmal1 [523], Clock [524] ve Per2 [525] gibi çekirdek saat genlerinin mutasyonlarına sahip fare modellerinde, diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalık [344] gibi çeşitli metabolik bozuklukların düzenlenmesinde sirkadiyen saat genlerinin anahtar rolü gösterilmiştir. Karaciğer ise SCN'deki merkezi saat aracılığıyla faz kaymasını senkronize eden ve ayrıca yemek zamanı ve besin bileşenleri tarafından sürüklenen sirkadiyen saat sistemindeki en önemli periferik saatlerden birisidir [410].

Besin alımı sinyalleri; karaciğer, yağ dokusu, bağırsak, kalp ve böbrek gibi periferik sirkadiyen saatleri farklı şekilde etkiler ve SCN merkezi saat üzerinde çok az veya hiç etkisi yoktur [526]. Artan kanıtlar, protein, vitaminler ve glikoz gibi besin bileşenlerinin sirkadiyen ritimleri, özellikle periferik saati sıfırlayabildiğini veya faz değiştirebildiğini göstermiştir [527]. Proantosiyanidinler [410] ve resveratrol [415] gibi fenolik bileşikler karaciğerdeki sirkadiyen saati modüle edebilmiştir. Sağlıksız bir yaşam tarzının bir parçası olarak fruktoz açısından zengin, enerji açısından yoğun bir diyet, diyete bağlı obeziteden de kısmen sorumlu olmaktadır.

Bu çalışma, Wistar albino türü sıçanlarda karaciğer sirkadiyen saat genlerinin salınımlarında ve saat kontrollü metabolizmada yüksek fruktozlu diyetin tetiklediği sirkadiyen yanlış hizalama ve alkolik olmayan karaciğer yağlanmasına karşı LGG'nin etkinliğini araştırmak amacıyla planlanmış ve yürütülmüştür.

5.1. Sıçanların Yem ve Su Tüketim Durumları ile Enerji Alım Miktarları

Yeme davranışı beslenme araştırmalarının ayrılmaz bir parçasıdır [528]. Vücut ağırlığının düzenlenmesinde, enerji alımını ve enerji harcamasını koordine etmek yer almaktadır [529]. Fruktoz tüketimi besin alımında azalma ile ilişkilendirilmiştir [530]. Yapılan bazı çalışmalarda fruktozlu su tüketen gruptaki sıçanların kontrol grubuna göre besin alımının daha az olduğu görülmüştür [531, 532]. Bu çalışmada da kontrol grubunun yem tüketim miktarı genellikle fruktozlu su tüketen gruplara kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Fruktozlu su tüketimi besin alımında azalmaya neden olmuştur. 7. haftadan sonra YFD+probiyotik grubuna uygulanan LGG takviyesinden sonra kontrol grubuna göre düşük olsa da YFD grubundan daha yüksek miktarda yem tüketimi olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1) (Şekil 4.1). Yapılan bir çalışmada 8 hafta süresince %20 fruktozlu su tüketen gruptaki sıçanların kontrol grubuna göre su alımının anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca toplam kalori alımlarına bakıldığında da kontrol grubu ve %25 fruktozlu su tüketen gruba kıyasla %20 fruktozlu su tüketen grubun toplam enerji (kalori) alımı ve içme suyundan elde ettiği enerji (kalori) tüketiminin daha yüksek olduğu bulunmuştur [531]. Fareler ile yapılan bir çalışmada 24 saat boyunca %10 fruktozlu su tüketen grubun sıvı alımı kontrol grubuna göre daha yüksek çıkmıştır [420]. Bu çalışmada ise genellikle kontrol grubunun su alımının fruktozlu su tüketen gruplardan daha yüksek olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2) (Şekil 4.2). 7.haftadan sonra LGG takviyesinin su alımını anlamlı olarak değiştirmedeği gözlenmiştir. Bu durumun sıçanlara pek hoş gelmeyen tatlı tattan kaynaklanıyor olabileceği, fruktozun iştahı baskılayabileceği ve özellikle probiyotik tüketiminin iştahı bir miktarda olsa iyileştirebileceği düşünülmektedir.

Enerji alımı vücut ağırlığının düzenlenmesinde önemli bir faktördür [533]. İnsanlarda yapılan bir araştırma, içeceklerden alınan enerjinin (kalorinin) 1965 – 2002 yılları arasında %21 oranında arttığını göstermiştir. Bu, içeceklerden alınan enerjinin kişi başına 222 kkal/gün arttığı anlamına gelmektedir [534]. Fruktozun metabolize edilme şekli ve YFD tarafından sağlanan enerjinin fazlalığı, sıçanlarda obezite durumuna yol açabilmektedir. Yapılan bir çalışmada diyetle fruktoz alan hayvanların su alımının daha yüksek yem ve enerji (kalori) alımının daha az olduğu görülmüştür [535]. Ritze ve diğerleri (2014) yaptıkları fare çalışmasında %30 fruktozlu su kullanılıp LGG takviyesi yapılan grupta enerji alımının en yüksek, kontrol grubunda ise %30 fruktozlu su +LGG ve %30 fruktozlu su alan gruba göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür [509]. Aksine,

Lactobacillus cinsinden bir başka tür olan *Lactobacillus casei* Shirota'nın, yapılan başka bir çalışmada fruktozla beslenen grupta enerji alımını önemli ölçüde artırdığı gözlenmiştir. Ancak, müdahale grupları arasında vücut ağırlığı artışı benzer olduğu için alınan bu enerjinin vücut kütlesine aktarılamadığı görülmüştür [536]. Yapılan bu çalışmada da sıçanların enerji alımlarına haftalar bazında bakıldığında anlamlı bir sonuç bulunamadığı görülmüştür (Çizelge 4.3) (Şekil 4.3). Kontrol grubunun su ve yem tüketim durumu genellikle diğer gruplardan yüksek olmasına rağmen arada anlamlı fark olmasa da fruktoz alımı enerji alımını arttırmıştır. Fruktoz tüketimi sağlanan gruplar arasında probiyotik takviyesi alan grubun enerji alımı arada anlamlı fark olmasa da daha yüksek çıkmıştır. Fruktoz alımı ile probiyotik takviyesi enerji alımının artmasına neden olmuştur. Fruktoz alımı her ne kadar iştahı azaltsada enerji içeriğinin artmasını sağlamıştır. Probiyotik ise bir miktar iştahı iyileştirdiği için enerji alımı YFD grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur.

5.2. Sıçanların Vücut Ağırlıklarındaki ve Boy Uzunluklarındaki Değişimler

Suyun hayati ihtiyacına ve önceki çalışmalardan elde edilen bulgulara dayanarak, içme suyunun karaciğerde patolojik değişiklikleri indüklemek için yeterli fruktoz uygulamasını sağlayan bir araç görevi görmesi beklenmektedir [509, 537]. Obeziteden bağımsız olarak uzun süre fruktozla beslenme, NAYKH için popüler bir hayvan modeli olduğundan, bazı çalışmalarda fruktoz gruplarında orta düzeyde vücut ağırlığı artışı olduğu sonucu elde edilmiştir [536, 538]. Başka bir çalışmada benzer ortamlarda, fruktozla beslenen farelerde enerji alımının standart beslenmeye kıyasla biraz daha yüksek olduğu gösterilmiştir, ancak bu durum vücut ağırlığı artışında beklenen bir artışa yol açmamıştır [521]. Bu çalışmada besin alımı YFD alan gruplarda daha az olmasına rağmen, grupların hiçbirinde vücut ağırlığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Çizelge 4.4). Bu durum ekstra yüksek fruktozlu su tüketiminin toplam enerji (kalori) alımını arttırmasından dolayı, fruktoz tüketmeyen gruptan daha az yem tüketimi olsa bile vücut ağırlığının değişmemesine neden olabilmektedir [531, 539].

Sıçanlarda, düzenli yem tüketen sıçanlara kıyasla enerji (kalori) alımındaki artışı önemli vücut ağırlığı artışı takip ettiğinden, fruktozla beslenmenin sonucu daha tartışmalıdır [540, 541]. Diğer taraftan ise yapılan çalışmalarda probiyotik takviyesinin, kullanılan hayvan modeline, diyet ve probiyotik suşuna bağlı olarak vücut ağırlığı alımında değişkenliğe

neden olduğu görülmektedir. Örneğin, Hsieh ve diğerleri (2013) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus reuteri* GMNL-263'ün, fruktozla beslenenlerde vücut ağırlığı alımını önemli ölçüde azaltırken [540], Ritze ve diğerleri (2014) çalışmasında LGG [509] veya Wagnerberger ve diğerleri (2013) çalışmasında *Lactobacillus casei* Shirota tüketiminin farelerde vücut ağırlığı üzerinde etki göstermediği bulunmuştur [536]. Ancak müdahale grupları arasında en düşük vücut ağırlığı alımına sahip oldukları için LGG, kontrol diyeti ile uygulandığında daha da belirgin vücut ağırlığı düşüklüğü gözlenmiştir [509]. LGG'nin vücut ağırlığı alımını azaltıcı özellikleri için potansiyel bir mekanizma olarak, Kim ve diğerleri (2013) tarafından yüksek yağlı diyetle bağlı diyabetik hayvan modeli kullanıp, LGG ile tedavi edilmiştir. 13 hafta süreyle LGG müdahalesi yapıldıktan sonra karaciğer ve vücut ağırlığında azalma ve insülin duyarlılığında iyileşme saptanmıştır. LGG ile tedavi edilen farelerde glukoneogenezde baskılanma ve yağ asidi oksidasyonu ile ilgili mRNA'da yukarı yönlü regülasyon gözlemlenmiştir. Ek olarak, bu farelerin epididimal yağ dokusunda adiponektin mRNA ekspresyonu da artmıştır. Ayrıca, bu değişiklikler sadece yüksek yağlı diyetle tedavi edilen farelerde belirgin şekilde görülmüş, ancak kontrol gruplarında görülmemiştir. Biriken yağ dokusu miktarını azaltan gelişmiş yağ asidi oksidasyonu ile vücut ağırlığı alımının sınırlandırıldığı ve artan insülin duyarlılığının metabolik sağlığı daha da iyileştirdiği öne sürülmüştür [542]. Yağ asidi sentezi ile ilgili mRNA'nın baskılanması, daha önce besinle beslenen ve LGG ile tedavi edilen farelerde gösterilmiştir ve epididimal yağ miktarı da azalmıştır ancak bu değişiklikler tüm vücut ağırlığı artışında azalmaya neden olmamıştır [543]. Bu çalışmada YFD+probiyotik grubunun ortalama enerji alımı diğer gruplardan yüksek olmasına rağmen probiyotiğinde etkisi ile vücut ağırlığında anlamlı bir artış görülmemiştir (Şekil 4.4) (Çizelge 4.4). Bu durum LGG'nin vücut ağırlığı artışını önleme yönünde bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca tek başına besin alımı deney sonunda ortalama ağırlıkları açıklamak için yeterli değildir ve vücut ağırlığı artışına aracılık eden enerji alımından başka faktörler bulunduğu da göz önünde bulundurulmalıdır.

5.3. Sıçanların Beden Kütle İndeksleri, Lee İndeksleri ve Bel Çevrelerindeki Değişimler

Fruktoz hem yağ asidi sentezini arttırarak hem de yağ asidi oksidasyonunu bloke ederek karaciğerde yağ birikimini uyarmaktadır [544]. Fruktoz, düzenleyici bir adım olmaksızın yağ asitlerine ve trigliseritlere metabolize edilmektedir. Bu nedenle, *de novo* lipogenez,

hepatositlerde kolesterol ve yağ asitlerinin sentezini, esterleşmesini, salgılanmasını ve birikimini artıran yukarı yönde regüle edilmiş lipojenik enzimlere yol açmaktadır [545]. Yapılan bir çalışmada %20 fruktozlu su tüketen grubun vücut ağırlığı ve beden kütle indeksi değeri kontrol grubuna kıyasla daha yüksek çıkmıştır [531, 546]. Alisi ve diğerleri (2014) yaptıkları bir çalışmada NAYKH'na sahip çocuklar 4 ay boyunca *Lactobacillus plantarum* BP06, *Lactobacillus acidophilus* BA05, *Lactobacillus helveticus* BD08, *Lactobacillus paracasei* BP07, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BL03, *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* BL04, *Bifidobacterium breve* BB02 ve *Streptococcus thermophilus* BT01 (VSL#3) suşları ile tedavi edilmiş ve BKİ değerlerinde belirgin bir şekilde azalma gözlemlenmiştir [547]. Yapılan bu çalışmada deney sonunda YFD grubunun BKİ değeri en yüksek ($0,83 \text{ kg/m}^2$), daha sonra sırasıyla YFD+probiyotik grubu ($0,80 \text{ kg/m}^2$) ve kontrol grubunun ($0,76 \text{ kg/m}^2$) geldiği görülmektedir. Ancak gruplar arası BKİ değerleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.8).

Yapılan bir çalışmada 11 hafta boyunca %20 fruktozlu su ile beslenen sıçanların kontrol grubuna göre Lee indeksleri daha yüksek çıkmıştır [548]. Yüksek fruktozlu diyetle trigliseritlerin adipositlerde birikip hipertrofiye neden olması ve sıçanlarda aşırı lipid üretiminin bir sonucu olarak vücut ağırlığı ve Lee indeksinde artış gözlenmesi beklenmektedir. Yapılan bu çalışmada deney sonunda YFD grubunun lee indeksi değeri en yüksek ($0,33 \sqrt[3]{\text{g/cm}}$), daha sonra sırasıyla YFD+probiyotik grubu ($0,32 \sqrt[3]{\text{g/cm}}$) ve kontrol grubunun ($0,31 \sqrt[3]{\text{g/cm}}$) geldiği görülmektedir. Ancak gruplar arası Lee indeksi değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.8).

Hepatik steatoz durumu, artan BKİ ile ilişkilidir ancak visceral yağ dokusu birim ağırlık bazında subkutan yağdan lipolitik olarak daha aktif olduğundan, bel çevresi olarak ölçümü sağlanan visceral yağlanma ile hepatik steatozun daha yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir [549, 550]. Daha önceki çalışmalarda fruktozlu su tüketen grubun abdominal çevre ölçümü kontrol grubuna kıyasla daha yüksek çıkmıştır [531, 546]. Yapılan bu çalışmada deney sonunda YFD grubunun bel çevresi değeri en yüksek (18,50 cm), daha sonra sırasıyla kontrol grubu (17,90 cm) ve YFD+probiyotik grubunun (17,85 cm) geldiği görülmektedir. Ancak gruplar arası bel çevresi değerleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Çizelge 4.8). Fruktozlu su tüketiminde daha yüksek enerji (kalori) alımı olduğu için daha fazla lipid birikimi ve dolayısıyla daha geniş bir

abdominal çevre elde edilmektedir ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı fark oluşumunu sağlamamıştır. YFD+probiyotik ve YFD grubundaki sıçanların başlangıç vücut ağırlıklarının düşük olması deney sonunda gruplar arası fark oluşumunun yeterince gözlenmemesine neden olmuştur. Ancak aradaki fark anlamlı olmasa da fruktoz tüketimi BKİ, Lee indeksi ve bel çevresi değerini arttırmış ve son 6 hafta LGG uygulanması BKİ, Lee indeksi ve bel çevresi değerlerinde azalma sağlamıştır. Probiyotik kullanımı fizyolojik parametreler üzerinde olumlu etki göstermiştir.

5.4. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Sıvı ve Yem Tüketimi ile Lee İndeksi ve Bel Çevresi Arasındaki Korelasyon

Obezite, enerji alımının enerji tüketimini aşması sonucu gözlemlenmektedir [551]. Yapılan bir çalışmada 11 hafta %20 fruktozlu su tükettirilen Wistar türü sıçanlarda yüksek fruktozlu diyet tarafından aşırı lipid üretiminin bir sonucu olarak, sıçanlarda artmış bel çevresi, vücut ağırlığı ve sudaki daha yüksek fruktoz alımı ve dolayısıyla fazla enerji alımı ile desteklenen Lee indeksi artışı gözlenmiştir [548]. Yapılan bu çalışmada ise sıvı ve yem tüketimi ile Lee indeksi ve bel çevresi arasında herhangi bir korelasyon gözlenmemiştir (Çizelge 4.9). Genel olarak kontrol grubunun sıvı ve yem tüketimleri diğer gruplardan yüksek olmasına rağmen fruktoz tüketiminden dolayı bu durum enerji alımına yansımamıştır. Hatta anlamlı fark olmasa da deney sonunda Lee indeksi, BKİ ve bel çevresinin YFD grubunda daha da artmasına ve probiyotiğin bu artışı olumlu yönde etkilemesine neden olmuştur.

5.5. Sıçanların Karaciğer Ağırlıklarındaki Değişimler

Yapılan çalışmalar da fruktoz tüketimi sonrası karaciğer ağırlıkları tutarlı bir şekilde yükselmediği için sonuçlarda tutarsız bulunmuştur [536, 537, 540]. Ancak genellikle yüksek fruktoz alımı karaciğer ağırlığını ve karaciğer indeksini arttırmaktadır. Kitagawa ve diğerleri (2012) yaptıkları çalışmada yüksek fruktoz ile beslenme sonucu karaciğer ağırlığı ve karın içi yağlanmanın arttığı gözlenmiştir [552]. Kawasaki ve diğerleri (2009) yaptıkları bir çalışmada ise sıçanları kontrol grubu, yüksek fruktoz, yüksek sukroz, yüksek yağ ve yüksek yağ+yüksek fruktozla beslenen gruplara bölmüş ve 5 hafta beslemişlerdir. Yüksek fruktoz ile beslenen grubun diğer gruplara göre hem karaciğer ağırlığında hem de önemli karaciğer / vücut ağırlığı oranında artış saptanmıştır [553]. Yüzde 20 fruktozlu su ile

beslenmesi sağlanan sıçanlarında yine kontrol grubuna kıyasla karaciğer indeksinin anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür [554]. Kim ve diğerleri (2013) yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde karaciğer ağırlığı üzerinde LGG'nin yararlı etkisini göstermiştir, ancak standart yemle beslenen farelere LGG verildiğinde bu etki görülmemiştir [542]. Wagnerberger ve diğerleri (2013) %30 fruktozla zenginleştirilmiş su uygulanan grup veya kontrol grubuna, 8 haftalık bir süre boyunca *Lactobacillus casei* Shirota suşu uygulandığında karaciğer ağırlıklarında herhangi bir farklılık görülmediği için bakteri türüne özgü bir etkiyi de varsaymışlardır [536]. Hsieh ve diğerleri (2013) probiyotik içermeyen başka bir grubun aksine, %65 fruktoz ve *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 içeren bir diyetle beslenen sıçanlarda karaciğer ağırlıklarını önemli ölçüde azaltmayı başarmışlardır [540]. Bununla birlikte, diyet müdahalesi, hayvan türü ve müdahale süresi deneyler arasında farklılık gösterdiğinden, bu sonuçlar dikkatli bir şekilde karşılaştırılmalıdır. Yapılan bu çalışmada da karaciğer ağırlıkları gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemekle birlikte en yüksek ortalama YFD grubunda (15,26 g), daha sonra sırasıyla YFD+probiyotik (12,30 g) ve kontrol grubunda (11,21 g) olduğu gözlenmiştir. Karaciğer indeksi değerinde de en yüksek ortalama YFD grubunda (%3,53), daha sonra sırasıyla YFD+probiyotik (%3,31) ve kontrol grubunda (%2,51) olduğu gözlenmiştir. YFD grubunun karaciğer indeksi değeri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek çıkmıştır. Fruktoz ile beslenmek sıçanlarda karaciğer ağırlıklarını arttırmış, LGG uygulaması ise bu artışı engellemiştir. Özellikle karaciğer indeksi fruktoz tüketen grupta anlamlı bir şekilde artış göstermiş ve LGG uygulanması bu durumu baskılayıcı özellik göstermiştir. Probiyotik kullanımı ile fruktozun karaciğer üzerinde oluşturabileceği hasarı baskılayıcı özellik gösterdiği bulunmuştur.

5.6. Histopatolojik Değerlendirme

Fruktoz, karaciğer tarafından hızlı alınmakta ve düzenleyici adım olan fosfofruktokinaz basamağını atladıktan sonra glikoliz yoluna girmektedir [555]. Besinlere eklenmiş şekerler arasında bulunan fruktoz, unlu mamüllerde ve içeceklerde ana tatlandırıcı haline geldiğinden, aşırı vücut ağırlığı artışına katkıda bulunan potansiyel bir faktördür [556]. Yapılan bir çalışmada NAYKH olan hastaların kontrollere kıyasla 2-3 kat daha fazla fruktoz tükettiği bulunmuştur [243]. Framingham Kalp Çalışması (Heart Study) kohortundan elde edilen veriler, şekerle tatlandırılmış içeceklerin tüketiminin artmasının,

genel enerji alımı gibi olası karıştırıcılardan bağımsız olarak karaciğer yağlanması ile ilişkili olduğunu göstermiştir [147]. Diğer taraftan NASH Klinik Araştırma Ağı fruktoz alımının artan hastalık progresyonu (yani hepatik fibrozis) ve azalan hepatik steatoz ile ilişkili olduğunu öne sürmüştür [145]. Büyük bir Finnish kohortundan elde edilen verilerde de fruktoz alımı ile NAYKH arasındaki ilişki desteklenmemiştir [557]. Bu verilerden yola çıkarak epidemiyolojik kanıtların tutarsız olduğu görülmektedir. Ayrıca diyetle şeker alımının vücut ağırlığı artışı ile ilişkili olduğu belirtilmektedir [558], bu da fruktoz alımı ile NAYKH arasındaki herhangi bir ilişkinin pozitif enerji dengesi ile karıştırılabileceğini göstermektedir. Başka bir çalışmada da karaciğer enzimlerinde fibrozis ve karaciğer inflamatuvar hücrelerin varlığı ile uyumlu bir artış gözlenmiştir [515]. Ritze ve diğerleri (2014) yaptıkları çalışmada %30 fruktozlu su uygulanan sıçan grubunda H&E boyama sonrası daha fazla yağlanma gözlenirken LGG takviyesi yapılan grupta yağlanmada azalma gözlenmiştir [509]. Kawasaki ve diğerleri (2009) yaptıkları çalışmada yüksek fruktoz tüketen grupta makroveziküler ve mikroveziküler steatoz ve lobular inflamasyon değeri diğer gruplardan daha yüksek çıkmıştır [553]. Yapılan bu çalışmada da H&E ile boyanmış histolojik kesitlerdeki morfolojik değerlendirme sonucu kontrol grubunda sağlıklı hücre yapısı gözlenirken, YFD grubunda belirgin bir yağlanma ve YFD+probiyotik grubunda ise santral ven etrafında yağlanmada azalma gözlenmiştir (Şekil 4.6). Skorlama sonucunda ise YFD grubunun steatoz, hepatoselüler balonlaşma ve NAS skoru diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek çıkmıştır ($p>0,05$). YFD+probiyotik grubunda, YFD grubuna kıyasla skor puanları düşmüştür. Kontrol grubunun skor puanları ise tüm gruplara göre düşük çıkmıştır. (Çizelge 4.11). YFD grubunda NAS skorunun 5 çıkması NAYKH oluştuğunun göstergesidir. Fruktoz uygulanması karaciğerde yağlanma düzeyini arttırmıştır ve LGG uygulanması ise yağlanmayı azaltmıştır.

5.7. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Biyokimyasal Bulguları

Fruktoz, bilinen bir NAYKH indükleyicisidir. “İki vuruş” teorisine göre “ilk vuruş” sırasında insülin direncini ve karaciğerde *de novo* lipogenezi teşvik ederek ve “ikinci vuruş” sırasında ise oksidatif stres ve inflamatuvar süreçleri tetikleyerek karaciğer steatozuna katkıda bulunmaktadır [136]. İnsülin direnci ise ilerleyen aşamalarda kan şekerinin yükselmesine neden olabilmektedir. Zhao ve diğerleri (2020) yaptıkları çalışmada yüksek yağlı yüksek fruktozlu diyetle beslenen sıçanların karaciğer enzimleri ve açlık kan glikozlarının önemli bir şekilde arttığı gözlenmiştir [559]. Ferreira-Santos ve

diğerleri (2020) ise yaptıkları çalışmada %20 fruktozlu su tükettirilen sıçanların açlık kan glikozu kontrol grubundan yüksek çıkmıştır [554]. Yapılan bu çalışmada YFD grubundaki kan şekeri fruktoz tüketiminden dolayı kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Probiyotik kullanımı ise anlamlı fark oluşturmada da kan şekerinde düşüklüğe neden olmuştur (Çizelge 4.13). Fruktoz kullanımı kan glikoz düzeyinin artmasına neden olmuştur, probiyotik kullanımı ise glikoz düzeyindeki artışı önleyici yönde hareket etmiştir.

Enerji (kalori) alımının artması, fazla enerjinin trigliserit olarak depolanmasına neden olur. Daha sonra alınan fazla kalori yağ dokusunda depolanır ve bir enerji deposu görevi görür [560]. Abdominal yağ dokusu birikimi hiperglisemi, dislipidemi ve hipertansiyon gelişiminde önemli bileşenlerdir [561]. Plazma trigliseritleri şekerli içecekler tarafından artmaktadır ve bu artış fruktoz bileşeninden kaynaklanmaktadır [562]. Diyetlerdeki artan fruktoz miktarının, fruktozfosfat aldolaz aktivitesini artırarak gliserol-fosfat ve asetil koenzim-A'nın artmasına neden olduğu ve böylece daha fazla trigliserit öncüsü sağladığı bildirilmiştir [563]. Yapılan bir çalışmada sıçanlara %60 fruktoz içeren bir diyet 5 hafta uygulandığında hepatik kolesterol konsantrasyonunda %89 ve hepatik trigliseritlerde %198 artış ve hepatik mikro ve makroveziküler steatoz ile sonuçlanmıştır [544]. Yapılan farklı çalışmalarda NAYKH olan hastalarda probiyotik takviyesi karaciğer fonksiyonlarının geliştirilmesi ve lipit profilinde iyileşmeye neden olmuştur [290, 291, 293]. Yapılan bu çalışmada YFD+probiyotik grubunun total kolesterol değeri kontrol grubundan anlamlı olarak düşük çıkmıştır. Ayrıca anlamlı fark olmasa da YFD grubuna kıyasla YFD+probiyotik grubunun da total kolesterol değeri düşük çıkmıştır (Çizelge 4.12). LGG kullanımı tüm gruplar arasında kolesterol değerinin en düşük olmasını sağlamıştır. Diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunmaması uygulanan fruktozun kolesterol seviyesinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını ancak LGG'nin iyileştirici özelliğinin olduğu gözlenmiştir.

Hepatositler tarafından üretilen ALT, AST ve alkalın fosfatazlar (ALP) olmak üzere 3 enzim vardır. Karaciğerin iltihaplanma durumunda ALT ve AST enzimleri yükselmektedir. Ancak ALP üretimi sadece karaciğere özgü olmadığı için AST ve ALT enzimleri bu çalışmada ölçülmüştür [546]. Fruktoz ile indüklenen NAYKH oluşturulan bir çalışmada fruktoz tüketen grubun kontrol grubuna göre AST, ALT ve total kolesterol değerleri

arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir [544]. 14 probiyotik bakteriyi içeren multiprobiyotik “symbiter” 8 hafta boyunca NAYKH olan hastalara uygulanmış ve probiyotik alan grupta AST ve GGT seviyelerinde azalma gözlenmiştir [292]. Ayrıca LGG suşu ile tedavi edilen NAYKH'lı obez çocuklarda, probiyotik alan grupta ALT'de bir azalma olması yoluyla karaciğer fonksiyonunda restorasyon olduğu gözlenmiştir [290]. Gruplar arası AST, ALT ve GGT değeri arasında anlamlı fark olmamakla birlikte kontrol grubunun AST değeri daha yüksek çıkmıştır. YFD grubunun ise ALT ve GGT değerleri daha yüksek çıkmış, probiyotik uygulanması ise bu seviyeleri düşürmüştür (Çizelge 4.13). Fruktoz tüketimine karşı probiyotik kullanımı ALT ve GGT seviyelerinde düşüklüğe neden olmuştur. Ancak inflamatuvar durum ile ilişkili olduğu ve yeterli inflamasyon oluşmadığı için AST, ALT ve GGT değerleri arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır.

5.8. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre İnflamatuvar Belirteç ve Hormon Düzeyleri

Fruktokinaz enziminin karaciğerde fruktozu fruktoz-1-fosfata fosforile etmedeki yüksek aktivitesi, hepatik ATP tükenmesine neden olabilmektedir. Fruktoz kaynaklı ATP tükenmesi hepatik nekroinflamasyonu teşvik ettiği için yüksek fruktoz tüketimi NAYKH patogeneze katkıda bulunabilmektedir [243]. Ayrıca yüksek fruktozlu bir diyetin LPS konsantrasyonlarını artırıp portal venden karaciğere girip inflamatuvar reaksiyonları tetiklediği bulunmuştur [564]. Yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu diyetle beslenen sıçanlarda IL-6 ve IL-1 β düzeyinin arttığı gözlenmiştir [559]. 15 hafta süreyle %20 fruktozlu su kullanılarak metabolik sendrom oluşturulan sıçanlara son 5 hafta *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus helveticus* takviyesi gavaj olarak uygulanmıştır. Fruktoz uygulaması böbrek dokusunda TNF- α , IL-10, IL-6 ve IL-1 β seviyelerini yükseltmiş, *Lactobacillus plantarum* takviyesi ise yüksek fruktozla beslenen sıçanlarda bu seviyeleri azaltmıştır [565]. Yüzde 30 fruktozlu su uygulanan fare çalışmasında LGG takviyesi ile IL-1 β seviyesi LGG uygulanmayan gruba göre azalmıştır [509]. Yapılan bu çalışmada gruplar arası IL-6 ve IL-1 β seviyesinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir (Çizelge 4.13). Fruktoz veya LGG uygulanması sıçan vücudunda anlamlı bir değişiklik sağlayacak kadar etkili bulunmamıştır.

Melatonin, serbest radikal ve ROS üretimini azaltarak serbest radikal süpürücü görev yapmakta ve mitokondriyal solunum zincirinin işlevini geliştirerek oksidatif strese karşı

etkili olmaktadır. Ayrıca SOD, GPx ve glutatyon redüktaz gibi çeşitli antioksidan enzimlerin seviyesini arttırmaktadır [566, 567]. Melatonin, sürekli üretilen serbest radikallere karşı hepatositlere bir tampon sağlar ve böylece oksidatif moleküler hasara ve metabolik işlev bozukluğuna karşı koruma sağlar. Melatonin, bu korumayı, antioksidan enzimlerin uyarılmasının bir sonucu olarak ve iç mitokondriyal membrandaki solunum komplekslerinden elektron sızıntısını azaltma (radikal kaçınma) nedeniyle, metabolitlerinin (antioksidan kaskadı olarak bilinir) çeşitli serbest radikal süpürme mekanizmaları aracılığıyla sağlamaktadır [568]. Melatonin salgısının azalması tümör oluşumunu ve yaşlanmayı, visceral yağlanmayı ve kardiyovasküler fonksiyonu hızlandırmaktadır [465, 569, 570]. Zebrabalığı larvalarında yapılan bir çalışmada probiyotik LGG'nin iştahı düzenlediği ve melatonin reseptörlerinin ekspresyonunu modüle ettiği bulunmuştur [571]. Yapılan bir çalışmada yüksek fruktoz (%60) ile beslenen sıçanlara melatonin uygulandığında metabolik sendromu iyileştirdiği görülmüştür [552]. Zaiton ve diğerleri (2011), farelere 8 hafta yüksek yağlı diyet uygulamasından sonra 8 hafta süreyle melatonin uygulamıştır (os başına 10 mg/kg vücut ağırlığı/gün, 1 os = 28,4 g) ve yüksek yağlı diyetin birlikte uygulanmasının karaciğer indeksinde (g/100g vücut ağırlığı) yüksek yağın sebep olduğu artışı azalttığını bildirmişlerdir [572]. Melatonin takviyesi uygulanan çalışmalarda iyileşmeler gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada YFD+probiyotik grubunun melatonin seviyesi kontrol grubu ve YFD grubundan anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Çizelge 4.13). Fruktoz uygulanması melatonin seviyesinin azalmasına yol açarak metabolik bozuklukların oluşmasına ve sirkadiyen saat gen ekspresyonlarında aksaklıklara neden olabilir. Probiyotikte bu seviyenin daha da düşmesi bu sonucun farklı çalışmalarla desteklenmesi gerekliliğini oluşturmaktadır.

Kanda aşırı trigliserit oluşumu trigliseridemi olarak bilinmektedir. Trigliseritin varlığı insülin duyarlılığını azaltmaktadır. Böylelikle insüline duyarlı doku tarafından glikoz alımı azalmaktadır. İlaveten devam eden lipoliz sürecine ve daha fazla gliserol ve serbest yağ asidi oluşmasına yol açmaktadır. Gliserol ve serbest yağ asitleri daha sonra yağ dokusuna girerek trigliseridi oluşturur. Bu döngü tekrarlanır ve daha fazla trigliserit oluşur [573]. Diğer taraftan da glikozun aksine fruktoz pankreas β -hüresinden insülin salgılanmasını uyarmamaktadır [574]. Dolayısıyla yüksek fruktoz alımı insülin direnci ve hiperinsülinemiye neden olmaktadır [575]. Sprague Dawley türü sıçanların yüksek fruktozlu diyetle beslenmesi sonucu insülin direncinde artış gözlenmiştir [576].

Lactobacillus acidophilus ve *Lactobacillus casei* içeren dahi probiyotiğinin 8 hafta yüksek fruktoz tüketimi üzerindeki (%21 fruktozlu içme suyu) etkisinin araştırıldığı bir çalışmada plazma insülin değeri yüksek fruktoz alan gruba kıyasla probiyotik alan grupta önemli derecede düşük çıkmıştır [577]. Zhang ve diğerleri (2014) yaptıkları bir çalışmada erkek Sprague Dawley sıçanları 5 gruba ayırmışlardır. 13 hafta normal beslenen grup, 13 hafta %25 fruktoz solüsyonu (%25) alan grup, 13 hafta fruktoz solüsyonu (%25) + son 4 hafta *Lactobacillus casei* Zhang alan grup, 9 hafta fruktoz solüsyonu (%25) alan grup ve 9 hafta fruktoz solüsyonu (%25) + *Lactobacillus casei* Zhang alan grup şeklinde ayırmışlardır. Çalışma sonucunda probiyotik *Lactobacillus casei* Zhang'ın bozulmuş glikoz toleransına sahip sıçanlarda oral glukoz toleransı üzerinde hem önleyici hem de iyileştirici etki gösterebileceği bulunmuştur. *Lactobacillus casei* Zhang'ın terapötik etkisinde, yüksek fruktozla beslenen ergenlik sonrası sıçanlarda *Bifidobacterium fragilis* aracılı bir K2 vitaminine bağlı osteokalsin mekanizması yoluyla oral glukoz toleransını iyileştirebileceği; önleyici etkisinde ise muhtemelen GLP-2 mekanizması yoluyla düşük bir insülin seviyesini korumak için fruktoz emilimini azaltabileceği belirtilmiştir [578]. Yapılan bu çalışmada gruplar arası anlamlı fark çıkmasa da en düşük insülin seviyesi kontrol grubunda gözlenmiştir (Çizelge 4.14). Fruktoz ve LGG uygulanması sıçanlarda insülin değerlerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Fruktoz uygulanması glikoz değerlerinin akut dönemde artışına neden olmuş ve bu durum henüz kronikleşmemiş olduğundan zamanla insülin değerlerinde artışa ve dolayısıyla insülin direncinin oluşmasına doğru bir eğilime neden olmadığı gözlemlenmiştir. Yüksek glikoz değerlerinin sürekliliği durumunda insülin değerleri de artışa geçebilir.

Melatonin reseptöründeki genetik bozukluklar, glikoz metabolizması yolundaki biyokimyasal bozukluklar ile ilişkilidir ve bu da Tip2 diyabet geliştirme riskini arttırmaktadır [579]. Yapılan bu çalışmada melatonin seviyesi en yüksek kontrol grubu daha sonra YFD grubu ve YFD+probiyotik grubunda gözlenmiştir. İnsülin seviyesi ise en düşük kontrol grubu daha sonra YFD grubu ve YFD+probiyotik grubunda gözlenmiştir. Melatonin ve insülin seviyesi zıt yönde hareket etmiştir. Melatonin seviyesi arttıkça insülin seviyesi azalmıştır (Çizelge 4.14). Bu durum melatonin seviyesinde oluşabilecek bir azalmanın insülin değerinin de artmasını tetikleyebileceğini ve metabolik bozukluklara zemin hazırlayabileceğini göstermektedir.

5.9. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Serum Zonulin Düzeyleri

Tight junction proteinler; claudin, zonula okludin (zonulin, ZO) ve okludinlerden oluşmaktadır. Zonulin, hücre polaritesi ve sinyalleşmede rol oynamaktadır, dolayısıyla bağırsak homeostazını sürdürmek için önemli bir bileşiktir [580]. Zonulin seviyesinin plazmada yükselmesi, bağırsak dokusunda ise düşmesi hasarın göstergesi olarak belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda çölyak hastalığı, Tip1 diyabet, obezite ile ilişkili insülin direnci ve NAYKH'ında plazma zonulin düzeylerinin arttığından bahsedilmiştir [581-583]. Yapılan bir çalışmada fruktozun aşırı kullanımının fare kolonik örneklerinde ZO-1 protein seviyesini azalttığı gösterilmiştir [584]. Benzer şekilde sıçanlar ile yapılan çalışmalarda da düşük ZO-1 seviyesine rastlanmıştır [585, 586]. Thuy ve diğerleri (2008) NAYKH olan hastalarda ve bir kontrol grubunda diyetle alınan yüksek fruktoz alımının NAYKH, daha yüksek bağırsak geçirgenliği ve plazma endotoksin belirteçleri ve hepatositlerde endotoksin reseptörü TLR4'ün daha yüksek ekspresyonu ile ilişkili olduğunu bildirmiştir [150]. NAYKH'lı ergenlerde yapılan randomize, kontrollü bir çalışmada 4 hafta boyunca glukozla kıyasla fruktoz tüketimi kanda endotoksinlerin artmasına neden olmuştur [587]. Firmicutes tarafından üretilen bütirat gibi bakteriyel ürünlerin, fruktoz kaynaklı bağırsak bariyerinin bozulmasını iyileştirebileceği belirtilmektedir [509]. LGG'nin bakteriyel enfeksiyonun neden olduğu epitel hücre hasarını iyileştirdiği ve ZO-1 protein ekspresyonunun azalmasını önlediği gösterilmiştir [588]. Ritze ve diğerleri (2014) yaptıkları bir çalışmada fareleri 4 gruba ayırıp 8 hafta boyunca %30 fruktozlu su, %30 fruktozlu su + LGG, kontrol ve kontrol+LGG şeklinde beslemişlerdir. Yüksek fruktozlu diyet alan farelere LGG uygulandığında, claudin-1 ve okludin ekspresyonunun arttığı bulunmuştur [509]. Yapılan bu çalışmada anlamlı fark gözlenmemekle birlikte en düşük zonulin seviyesi YFD grubunda gözlenmiştir. Daha sonra sırasıyla kontrol grubu ve YFD+probiyotik grubu gelmektedir (Çizelge 4.14). Bağırsak hasarının bir göstergesi olan zonulin seviyesine plazma ve bağırsak dokusunda değil serumda bakılmıştır. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemesi uygulanan fruktozun doz veya süresinin ve LGG'nin serum zonulin düzeylerini etkilemediği gözlenmiştir. Bağırsak hasarının daha net gözlenmesi için başka çalışmalar ile desteklenmeli ve bağırsak dokusundaki zonulin düzeyi de incelenmelidir.

Mikrobiyal kompozisyon gastrointestinal numunelerden veya dışkılarından belirlenmemiş olsa da, LGG uygulamasının etkilerinin kısmen mikrobiyotadaki değişiklikler yoluyla ortaya çıktığı varsayılabilir. Ji ve diğerleri (2012), LGG'nin, bağırsak bakterileri tarafından üretilen metabolit havuzunu daha fazla etkileyebilecek filum veya cins düzeyinde nispi bollukları değiştirebileceğini göstermiştir [543]. Bu nedenle, azalan besin alımının arkasındaki potansiyel mekanizmalardan biri, konakçı enerji metabolizması için substratlar veren sindirilemeyen polisakkaritlerin parçalanması ile ilgili de olabilir. Yüksek fruktozla beslenme, mikrobiyal çeşitliliğin azalması ve disbiyoz ile karakterize edilen mikrobiyotada değişikliklere neden olmaktadır [589-591].

5.10. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Oksidatif Stres ve Antioksidan Enzim Düzeyleri

Obezitenin dislipidemik profil gelişimi için birincil risk faktörü olduğu ve oksidatif stresin obezitenin çeşitli olumsuz etkilerinde rol oynayabileceği konusunda artan bir farkındalık vardır [528]. Oksijen yakıtının oksidatif metabolizmasında kullanılması, serbest radikal veya ROS üretimi ile sonuçlanmaktadır [592]. Artan enerji (kalori) alımı, mitokondriyal membran akışkanlığını azaltmada ve ROS oluşumunu arttırmada önemli bir faktördür [593]. Bu nedenle, ROS belirli fizyolojik süreçler için gerekli olmasına rağmen, bu konsantrasyon yükseldiğinde, vücudun antioksidan savunması yetersiz kalabilmektedir. Sonuçta, oksidatif stres adı verilen, oksidanlar ve antioksidanlar sistemleri arasında dengesizlik olan bir durum oluşmaktadır [594]. Reaktif oksijen türlerinin artan üretimi ile lipit peroksitler üretilmekte ve daha sonra proteinlere, hepatik membranlara ve DNA'ya zarar vermektedir [595]. Oksidatif stres koşullarında, hücresel mitokondri, enzimatik antioksidanlardan (örneğin, SOD, glutatyon, glutatyon GPx) ve enzimatik olmayan antioksidanlardan (örneğin tokoferol, askorbik asit, karotenoidler, glutatyon ve hücrelere sağlanan flavonoidler) daha fazla ROS (örneğin hidroksil radikalleri, süperoksit anyon radikalleri ve hidrojen peroksit) üretmektedir [596]. Yüksek fruktoz alımı, esas olarak antioksidan savunma sistemlerinin bozulması yoluyla oksidatif stresi indüklemekte ve metabolik bozukluklara yol açmaktadır [575, 597].

Bifidobacteria, Lactobacillus, Enterococcus veya Bacillus gibi farklı probiyotik suşları, endotoksinleri bağlayarak kan ve dışkıdaki amonyak seviyesinin düşmesine neden olmaktadır [598]. İnsanlarda, *Lactobacillus rhamnosus*, yüksek fiziksel stres durumlarında

güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Oksidatif strese maruz kalan sporcuların, *Lactobacillus rhamnosus*'un ROS etkilerini nötralize etme ve antioksidan seviyelerini artırma yeteneğinden faydalanabileceği belirtilmektedir [599]. LGG suşunun sırasıyla, antioksidan olmayan *Lactobacillus paracasei* Fn032 ve *Lactobacillus plantarum* Fn001 ile karşılaştırıldığında, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali varlığında hayatta kalma süresinin önemli ölçüde daha uzun olduğu gösterilmiştir [600]. Yetmiş sekiz laktik asit bakteri suşunun incelendiği bir çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690'nin antioksidan kapasiteyi arttırdığı bulunmuştur [601]. LGG suşunun, nötrofillerin fagositik kapasitesini ve ROS üretimini aşağı yönde modüle ederek güçlü antioksidatif aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [602]. Düşük moleküler ağırlıklı bir bileşik salgıladığı gösterilen LGG'nin, geniş bir gram-negatif, gram pozitif ve anaerobik bakteri spektrumunu inhibe edebildiği gösterilmektedir [603]. Seth ve diğerleri (2008), LGG'nin, mitogen-activated protein kinase (MAPK)'ya bağlı bir mekanizma ile H_2O_2 'nin neden olduğu epitelyal bariyer bozulmasını iyileştirebilen çözünür proteinler p40 ve p75 ürettiğini gözlemlemişlerdir [604].

Lipid peroksidasyonunun aldehit ürünü olan MDA, protein ve DNA için toksiktir ve hepatik stellat hücre aktivasyonunu indüklemektedir. Bunlar karaciğerdeki ana kollajen üreten hücrelerdir ve ekstraselüler matriks protein birikiminin artmasına neden olmaktadır [605]. Yapılan bir çalışmada 15 hafta %20 fruktoz ile beslenen ratlara son 6 hafta *Lactobacillus helveticus* veya *Lactobacillus plantarum* uygulanmıştır. Plazma MDA seviyesinin fruktoz uygulanan grupta yüksek olduğu ve probiyotik MDA seviyesini modüle etmediği görülmüştür [606]. Yapılan bu çalışmada ise MDA seviyesinin en yüksek YFD grubunda, en düşük ise kontrol grubunda olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.15). Fruktoz alımı MDA seviyesini ve dolayısıyla oksidatif stresi arttırmıştır. Probiyotik uygulanması YFD grubuna göre anlamlı olmasa da MDA seviyesinin düşmesine neden olmuştur ve yıkımın daha az olduğu görülmektedir. Fruktoz uygulanması oksidatif stres oluşum yollarını aktive ederken LGG uygulanması bu yolların bastırılmasını sağlamıştır.

Park ve diğerleri (2020) yaptıkları çalışmada yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu diyet ve *Lactobacillus plantarum* ATG-K2 ve ATG-K6 suşlarının antioksidan enzimler üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Serum SOD, GPx ve katalaz enzim aktiviteleri yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu diyet ve normal diyet ile beslenen grupta belirgin şekilde düşük iken

probiyotik uygulamasının enzim aktivitelerini arttırdığı gözlenmiştir [607]. Yapılan bu çalışmada ise GSH, SOD ve GPx miktarı en yüksek YFD+probiyotik grubunda ve GSSG miktarı ise en yüksek YFD grubunda olduğu gözlenmiştir. Oksidan olan MDA seviyesi arttıkça antioksidan savunma sistem elemanları olan GSH, GSSG, SOD ve GPx miktarları da kontrol grubuna göre artmıştır (Çizelge 4.15). Probiyotik takviyesi yüksek fruktozun neden olduğu oksidatif stresi azaltmıştır. Olası mekanizmalara bakıldığında plazmadaki 8-hidroksi-20-deoksiguanozin seviyesinin azalması [284], MutL homolog 1 (MLH1) promotörünün metilasyonunun azalması [608] ve SOD aktivitesinde önemli ölçüde artış olabileceği belirtilmektedir [609].

Oksidatif stres NAYKH'da karaciğer yetmezliğine yol açsa da, antioksidan enzim üretimi kümülatif redoks dengesini korumaktadır [610]. GSH oksidatif hasara karşı koruyucu rol oynarken, GSSG ise oksidanların yol açtığı doku hasarı sonucu yükselmektedir. GSH/GSSG oranı hücrel redoks göstergesidir ve hücrenin oksidatif durumu hakkında bilgi vermektedir. Bu oran ne kadar düşerse oksidatif stres te o derece yükselmiş demektir [611]. Bu çalışmada GSH/GSSG oranının en düşük YFD grubunda, en yüksek ise kontrol grubunda olması oksidatif hasarın en fazla YFD grubunda olduğunu, en az ise kontrol grubunda olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan LGG, fruktozun olumsuz etkilediği antioksidan kapasitenin korunmasına ve oksidatif stresin düşürülmesine yardımcı olmuştur.

5.11. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Sirkadiyen Saat Gen Düzeyleri

Sirkadiyen saat mekanizmasının merkezi özelliği, çekirdek saat genlerini içeren transkripsiyonel-translasyonel geri besleme döngüsü olan biyolojik denge eylemidir. Çekirdek saat genleri; periyot genleri (Per1, Per2 ve Per3), kriptokrom genleri (Cry1 ve Cry2), Bmal1 (diğer adı ARNTL), Clock (veya ortoloğu NPAS2) ve nükleer reseptörleri Rev-Erb (NR1D1 ve NR1D2) ve Ror (Rora, Rorb ve Rorc) kodlayan genlerdir. Bu moleküler saat tarafından üretilen ritmik sinyal, sirkadiyen bir periyot olan yaklaşık 24 saatlik bir periyoda sahiptir [612]. Clock ve Bmal1 proteinleri heterodimer oluşturup Per1 geninin transkripsiyonunu artırır. Per ve Cry proteinleri ise nükleustan sitoplazmaya geçer ve heterodimerize olarak Clock/Bmal1 ile indüklenen gen ekspresyonunu inhibe eder [613]. Ror- α , Bmal1 geninin transkripsiyonunu aktive ederken Rev-Erb α , Clock ve Bmal1 genlerinin ekspresyonlarını baskılamaktadır [614]. van der Veen ve diğerleri (2006)

ultradiyen aktivitesi ve beslenme ritimleri olan bir kemirgen olan yaygın bir tarla faresi *Microtus arvalis*'in SCN'sindeki ve karaciğerindeki sirkadiyen saat genlerinin ekspresyonunu incelemişlerdir. Karaciğerlerinde sirkadiyen gen ekspresyonunda 4 ila 6 saatlik bir faz ilerlemesi olduğu ve toplam besin alımının %74'e düştüğü bildirilmiştir [615]. Hipotalamustaki SCN merkezi saatin ana eşzamanlayıcısı ışık olmasının yanı sıra, sosyal olaylar, sıcaklık veya yemek zamanlaması gibi diğer birçok uyaran beyin bölgeleri ve periferik dokularda sirkadiyen ritimleri etkileyebilmektedir. Bu durum lipid ve glikoz metabolizmasına ve diğer önemli fizyolojik fonksiyonlara dahil olan karaciğer için ayrıca önem kazanmaktadır [616]. Diyetteki yağ [403] veya resveratrol [411, 416] gibi fenolik bileşikler de önemli eşzamanlayıcılar olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada probiyotik kullanımının karaciğerdeki moleküler saati modüle etmek için bir uyaran olarak hareket etme kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bmal1-/- ve Clock mutant farelerin hiperlipidemi ve hepatik steatoz gösterdiği bulunmuştur [617, 618]. Per2-/- farelerin değiştirilmiş lipid metabolizması gösterdiği gözlenmiştir [525]. Rev-Erb α ablasyonunun hepatik steatoza yol açtığı bulunmuştur [619]. Vücuttaki işlevleri bu kadar önemli olan genlerin seviyesine bakıldığında ise aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonu ve apoptoziste rol alan hedef genlerin ekspresyon oranlarıyla bağlantılı olabileceği belirtilmiştir. Kansersiz olmayan dokulara göre kanserli dokularda ise PER2'nin yükseldiği bulunmuştur [620]. Bmal1 ile zıt yönde hareket eden Rev-Erb α seviyesi ile ilgili yapılan bir çalışmaya bakıldığında ise yüksek yağlı beslenen sıçanların beyaz adipoz dokusuna bakılmıştır. Rev-Erb α ve Bmal1'in enzim aktivitesinin yüksek yağlı beslenme ile arttığı ve resveratrol ile azaldığı gözlenmiştir [416]. Dolayısıyla hasar durumlarında Rev-Erb α düzeyi artabilmektedir. Yapılan bu çalışmada sirkadiyen saat gen ekspresyonlarının düzeyine bakıldığında ise Clock, Bmal1, Rev-Erb α ve Per2 genleri mRNA düzeyleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemekle birlikte fruktoz uygulaması ile gen ekspresyon düzeylerinin arttığı LGG takviyesi ile azalmaya geçtiği görülmüştür (Çizelge 4.16). Genlerin olması gereken düzeyde salınması pozitif feedback ve negatif feedback döngüsü için gerekli olduğundan fruktoz tüketiminin sirkadiyen gen salınımını arttırıp hasar oluşumuna neden olduğu ve LGG'nin bu etkiyi azalttığı gözlemlenmiştir. LGG sirkadiyen gen salınımını onararak karaciğerin patolojik hasarının önüne geçebilir.

5.12. Sıçanların Diyet Müdahale Gruplarına Göre Serum Zonulin Düzeyi ile Biyokimyasal Bulgular, İnflamatuar Belirteçler, Antioksidan Durum, Hormon Düzeyleri ve Sirkadiyen Ritim Gen Düzeyleri Arasındaki İlişki

Karaciğerde fruktoz, negatif geri besleme kontrolü olmayan fruktokinaz-c enzimi tarafından metabolize edilir. Fruktokinaz-C, kontrol edilmeyen fruktoz metabolizmasının sonucunda ATP tükenmesine ve tight junction proteinlerinin ekspresyonunun azalmasına yol açarak geçirgenliğin ve endotokseminin artmasına neden olduğu ince bağırsakta da bulunur [149]. Fruktoz tüketiminden sonra hastalarda artan inflammatuar sitokin seviyesi, intestinal bariyer disfonksiyonuna neden olabilir ve endotoksinlerin kan dolaşımına girmesine izin vererek mitokondriyal disfonksiyona yol açarak insülin direncini ve oksidatif stresi indükleyip inflammatuar bir yanıtı yol açabilir [621]. Son zamanlarda farelerde yapılan araştırmalar, ince bağırsak ve bağırsak bakterilerinin diyetteki fruktozu KZYA'ne ve glikoza metabolize ettiğini ve böylece fruktozun karaciğere girişini kontrol ettiğini göstermiştir [505]. Ayrıca, fruktoz ince bağırsakta tam olarak emilmediğinde, fazla fruktoz kalın bağırsağa taşınarak fruktoz emilim bozukluğu semptomlarına neden olmaktadır [622]. Bu nedenle ince bağırsak, fruktoz toksisitesinin kontrolünde vazgeçilmez bir rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada serbest yağ asitleri, HDL kolesterol, bilirubin ve laktat gibi dolaşımdaki biyobelirteçlerin bolluğundaki günlük varyasyonun, mikrobiyomun yokluğundan büyük ölçüde etkilendiği bulunmuştur [623]. Zhang ve diğerleri (2014) yeni tanı almış diyabetli bireylerde serum zonulin düzeyini incelemişlerdir. Glukoz toleransının bozulmasıyla birlikte serum zonulin düzeyinde artış gözlemlemişlerdir [624]. Yapılan bu çalışmada gruplar arası total kolesterol, glikoz ve GGT değerleri ile zonulin seviyesi arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir. Ancak kontrol grubunun AST ve ALT değerleri ile zonulin değeri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir (Çizelge 4.17). Kontrol grubunda bağırsak geçirgenliğinin göstergesi olan zonulin değerinin artması karaciğer enzimleri olan AST ve ALT değerinin artışına neden olmuş olabilir.

Zonulin, tight junction yapısını modüle eden bir proteindir. Bağırsak epitelyal tight junction geçirgenliğinin IL-6 modülasyonu, AP-1'in JNK aktivasyonu ve claudin-2 geninin AP-1 aktivasyonu ile düzenlendiği belirtilmektedir [625]. Diyabetik retinopati Tip2 diyabet hastalarında ölçülen serum zonulin ve IL-6 seviyeleri arasında önemli pozitif korelasyon gözlenmiştir [626]. Gebe olmayan kadınlarda yapılan kesitsel bir çalışmada,

daha yüksek zonulin seviyeleri, daha yüksek inflamatuvar belirteçler (serum CRP ve IL-6) ile ilişkilendirilmiştir. Serum zonulin düzeyleri ile BKİ, bel ve kalça çevresi ölçümleri ve yağ kütlesi arasında anlamlı ilişkiler olduğu belirtilmiştir [627]. Yapılan bu çalışmada gruplar arası IL-6 ve IL-1 β değerleri ile zonulin düzeyi arasında anlamlı korelasyon gözlenmemiştir. Lee indeksi ve zonulin düzeyi ise YFD+probiyotik grubunda pozitif korelasyon göstermiştir (Çizelge 4.17). Bu grupta literatürde belirtildiği gibi zonulin düzeyi arttıkça Lee indeksinin arttığı bulunmuştur. Bağırsakta geçirgenliğin artması obeziteyi tetikleyebilmektedir.

Fruktoz, bağırsak geçirgenliğini arttırıp portal dolaşımda endotoksinlerin translokasyonuna yol açar ve bu da sonunda karaciğerdeki kupffer hücrelerini aktive eder ve NAYKH'na yol açar. Endotoksinler ayrıca karaciğerde oksidatif stresi tetikleyebilir ve NAYKH'ndan NASH'a ve siroza doğru ilerlemeye yol açabilir [628]. Yapılan bu çalışmada glutatyon (GSH, GSSG), SOD, GPx ve MDA değerleri ile zonulin arasında korelasyon gözlenmemiştir (Çizelge 4.17). Zonulin düzeyinin artması oksidatif stresi ve antioksidan enzimleri etkilememiştir.

Zonulin, hücre içi sıkı bağlantıların temperlenmesi yoluyla bağırsak geçirgenliğinin düzenleyicisi olarak ve bağırsak geçirgenliğinin bilgilendirici bir belirteci olarak gösterilmiştir [629, 630]. Çölyak hastalığı, tip 1 diyabet ve obezite ile ilişkili insülin direncinde artan plazma zonulin düzeylerinden bahsedilmektedir [581, 582]. İnsülin duyarlılığı ile plazma zonulin arasındaki ilişki, obezite ile ilişkili dolaşımdaki IL-6 artışına aracılık ediyor olabileceği düşünülmektedir [631]. NAYKH olan hastalar ile kontrol grubunun kıyaslandığı bir çalışmada NAYKH açlık insülini ve serum zonulinde önemli artışlar gözlenmiştir. Ayrıca NAYKH olanlarda serum zonulin düzeyi ile açlık insülini ve IL-6 düzeyi pozitif korelasyon göstermiştir [583]. Yapılan bu çalışmada insülin düzeyi ile zonulin arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir (Çizelge 4.17). Ancak anlamlı olamaa da pozitif yönlü bir ilişki mevcuttur. Bu konuda pankreası da hedef alan daha fazla çalışma yapıp insülin ve zonulin arasındaki ilişkinin aydınlatılması gerekmektedir.

Dekstran sülfat sodyum ile ratların nöroinflamasyon ve karaciğer hasarının indüklendiği bir çalışmada melatonin tedavisi sonrası plazma zonulin düzeyinde azalma gözlenmiştir [632]. Yapılan bu çalışmada kontrol grubunun melatonin düzeyi ile serum zonulin düzeyi

arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir (Çizelge 4.17). Kontrol grubundaki sıçanlarda zonulin düzeyi arttıkça melatonin miktarının azaldığı ve dolayısıyla sirkadiyen ritmi olumsuz yönde etkileyebileceği düşünülebilir. Bağırsak hasarının artmasını engelleyici tedaviler geliştirerek melatonin miktarının azalmasının önüne geçilebilir ve sirkadiyen saat gen salınımının istenilen düzeylere çekilmesi sağlanabilir.

Periferik saatler arasında hepatik sirkadiyen saat en önemlilerinden birisidir. Çünkü karaciğer metabolizma ve enerji üretiminde çok önemli bir rol oynamaktadır, dolayısıyla konağın fizyolojik durumunu önemli ölçüde etkilemektedir [410]. Örneğin karaciğer, glikoz homeostazının düzenlenmesinden ve ayrıca kolesterolün sentezinden ve uzaklaştırılmasından sorumlu ara metabolizmanın ana organıdır [633]. Yapılan bir çalışmada, tüm transkriptlerin %10'unun veya tüm proteinlerin %20'sinin fare karaciğerinde sirkadiyen düzenleme altında olduğu gösterilmiş ve bu organdaki sirkadiyen saatin önemi vurgulanmıştır [634]. İlginç bir şekilde, karaciğerdeki kanın çoğu portal venden sağlandığından, mikrobiyal metabolitler ve bağırsaktan türetilen toksinler sürekli olarak karaciğere girer, bu nedenle karaciğer, bağırsak mikrobiyotasının bileşimi ve işlevinden büyük ölçüde etkilenebilmektedir [635].

Bağırsak florasının, yüksek yağlı diyetle yanıt olarak konakçı karaciğer saatinin PPAR γ güdümlü yeniden programlanmasına aracılık ettiği ve bağırsak mikrobiyotasının tükenmesinin bu etkiyi tersine çevirebileceği, bağırsak florasının saatin yeniden programlanması ve karaciğer sirkadiyen homeostazındaki kritik rolünü öne sürdüğü gösterilmiştir [479]. Montagner ve diğerleri (2016) bağırsak florasının, karaciğer çekirdek saat genlerinin salınımları ve bunların aşağı akış hedef genlerinin yanı sıra saat kontrollü işlevler üzerinde derin bir etkisi olduğunu bildirmiştir. Çalışmalarında, germ-free fare karaciğerindeki Bmal1, Rev-erb α , Rev-erb β , Per1, Per2 ve Cry1, spesifik patojen içermeyen farelerdekilere kıyasla oldukça farklı mRNA ekspresyon paternleri göstermiştir. Hepatik saat çıktı düzenleyicilerinin ifade modeli germ-free farelerinde bozulmuştur. Hepatik metabolom analizleri, saate bağlı gen ekspresyon modellerindeki bu değişikliklerin, glukoz, lipid ve ksenogenik metabolizmadaki günlük değişiklikler ve ayrıca redoks dengesi ve protein döngüsü ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır [623]. Fare modelinde, bütirat enjeksiyonu karaciğerde Per2:Bmal1 mRNA oranını önemli ölçüde artırmıştır, ancak mediobasal hipotalamusta bu etki görülmemiştir. Burada hepatik sirkadiyen saatin KZYA'ne merkezi sirkadiyen saatten daha duyarlı olduğunu

göstermektedir [402]. Ayrıca, Thaiss ve diğerleri (2016) bağırsak mikrobiyotasının, amino asitler ve poliaminler gibi salınan bağırsak metabolitleri yoluyla sirkadiyen hepatik transkriptomu programlayabildiğini de göstermiştir [480]. Otuz iki tıp öğrencisi ile yapılan bir klinik denemede, *Lactobacillus gasseri* CP2305 probiyotik uygulaması ile Pittsburgh Uyku Kalitesi Ölçeği (Pittsburgh Sleep Quality Index, PSQI) skoruna bakılmış ve uyku kalitesini önemli ölçüde etkilediği bulunmuştur [636]. Çift kör randomize kontrollü bir çalışmada, genç sağlıklı katılımcılara günlük bir probiyotik karışım dozu (*Lactobacillus rhamnosus* LR06, *Bifidobacterium longum* BL04, *Lactobacillus plantarum* LP01 ve *Lactobacillus fermentum* LF16) ile takviyenin Pittsburgh Uyku Kalitesi skorunda bir düşüşe yol açtığı bulunmuştur [637]. Diğer psikobiyotiklerin de anksiyolitik ve antidepresan etkiler sergilediği gösterilmiştir. Bu etkilerin bazı bakterilerin hipotalamus-hipofiz adrenal aksı (HPA) aktivitesini azaltma ve anti-inflamatuar etkilerden kaynaklanabildiği belirtilmiştir [638]. Yapılan bu çalışmada serum zonulin ile karaciğer Clock, Rev-Erba ve Per2 genlerinin mRNA düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir. Genel olarak ve YFD gubunda zonulin düzeyi ile Bmal1'in mRNA seviyesi arasında negatif bir korelasyon belirlenmiştir (Çizelge 4.17). Serum zonulin düzeyi arttıkça karaciğerde Bmal1'in mRNA seviyesi azalmaktadır. Probiyotik uygulanan grupta ise zonulin düzeyi ile sirkadiyen saat gen düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir. Bu etkinin gözlemlenebilmesi için başka çalışmalarda zonulinin bağırsak dokusunda da bakılması veya farklı probiyotik suşlarının / miktarlarının denenerek alternatiflerin üretilmesi gerekmektedir.

5.13. Sıçanların Sirkadiyen Saat Gen Düzeyleri ile Karaciğer Organ Ağırlığı, Lee İndeksi, Oksidatif Stres Durumu, Biyokimyasal Bulgular, İnflamatuar Belirteçler ve Hormon Değerleri Arasındaki İlişki

Vücudumuzun ve hücrelerimizin ihtiyaç duyduğu enerji, aydınlık-karanlık döngüsü boyunca değişir. Bu yirmi dört saatlik döngü sırasında karbonhidratların, lipidlerin ve proteinlerin parçalanması değişir. Örneğin glukoneogenez gündüz meydana gelirken glikojenoliz uyku sırasında zirve yapmaktadır [524]. Günlük insülin varyasyonu, kortizol ritmi ile ters orantılıdır. İnsülin sekresyonu gece uykusu sırasında yükselir, ancak gece boyunca artan klirens nedeniyle insülinin serum seviyesi sekresyonu ile korelasyon göstermez. Glikoz seviyeleri, gece uykusu sırasında büyüme hormonu seviyeleri ile

bağlantılı olarak artmaktadır [639]. Bu sirkadiyen salınım modelinin kaybı, insanlarda obezite ile ilişkilidir. Yapılan bu çalışmada karaciğer sirkadiyen saat gen düzeyleri ile karaciğer organ ağırlığı arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir ve sadece YFD grubunda Lee indeksinin artması Clock geninin ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon göstermiştir (Çizelge 4.17). YFD grubundaki sıçanlarda fruktoz tüketiminin artması Lee indeksini arttırmış ve Clock geninin artmasına neden olmuştur.

Sirkadiyen ritimlerin oksidatif stres savunma sistemi üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. Serbest radikallerden korunmada yer alan birkaç anahtar enzim ve antioksidan, ekspresyon veya aktivite düzeyinde sirkadiyen ritimle salınım yapmaktadır. Bunlara katalaz, GSH, SOD, GPx ve GSSG dahildir. Sirkadiyen ritimler ve oksidatif stres, her ikisi de birkaç farklı hastalıkta oynadıkları rolle bağlantılıdır. Çalışmalar ile görülmektedir ki her enzimin en az bir formu sirkadiyen tarzda düzenlenmekte ve hastalık patolojilerini etkilemek için yeterli olmaktadır [640]. Yapılan bu çalışmada kontrol grubunda Clock ve Rev-Erba gen ekspresyon seviyelerinin artması MDA seviyesini azaltmıştır (Çizelge 4.18) (Çizelge 4.20). YFD grubunda Rev-Erba gen ekspresyon seviyesinin artması GSSG'yi arttırıp GSH/GSSG oranını azaltmıştır (Çizelge 4.20). Probiyotik uygulanan grupta ise Clock gen ekspresyon seviyelerinin artması GSH, GSSG, MDA ve GPx değerlerinde anlamlı artışlara neden olmuştur (Çizelge 4.28). Probiyotik uygulanan grupta Bmal1 gen ekspresyon seviyelerinin artması ise GSSG ve MDA değerinin artmasını sağlamıştır (Çizelge 4.19). Özellikle probiyotik uygulanan grupta ve özellikle Clock ve Bmal1 gen ekspresyon seviyelerinde gözlenen bir artış oksidatif stres göstergelerinin artmasına neden olmuştur. Dolayısı ile bu etkiler probiyotik uygulanan grupta daha belirgin kendini göstermektedir ve bu sirkadiyen gen seviyelerindeki düşüş oksidatif stres belirteçlerinde de belirgin bir şekilde düşme görülmesini sağlayabilmektedir. Sirkadiyen saat gen ekspresyon seviyeleri ile oksidan ve antioksidan enzimler arasındaki moleküler mekanizmanın aydınlatılması için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

C57BL/6J türü CLOCK mutant farelerde, büyük ölçüde azaltılmış bir günlük beslenme ritmi, metabolik sendrom ve önemli ölçüde artan enerji alımı gözlenmiştir [459]. ICR geçmişine sahip saat mutant fareleri, bozulmuş diyet yağ emiliminden dolayı yüksek yağlı bir diyetle daha az derecede obez olmuşlardır [641]. Bu nedenle metabolik anormalliğin, azaltılmış günlük beslenme ritminin sonucu olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır.

Lamia ve diğeri (2008) karaciğere özgü bir Bmal1 delesyonu olan fare modeli oluşturmuşlardır ve karaciğerdeki Bmal1 fonksiyonunun, sistemik glukoz homeostazının sirkadiyen düzenlenmesi için gerekli olduğunu göstermişlerdir [633]. Anormal ritme bağlı fizyolojik bozuklukların 2 farklı nedenle ortaya çıktığı düşünülebilir. İlk doğrudan ve birincil neden, saat geninin kendisinin patolojik etkiyi indüklemesidir. Diğer dolaylı ve sistematik neden, anormal ritmin kendisinin genetik olarak normal hayvanlarda fizyolojik anormalliğe neden olmasıdır. Bu nedenle, genetik olarak normal hayvanlarda sirkadiyen ritmin fizyolojik önemini belirlemek önemlidir. Bmal1 nakavt farelerle yapılan bir çalışmada glukoz metabolizmasında değişiklikler gözlemlenirken [642], başka bir çalışmada Bmal1 nakavt farelerin serumlarında glukoz değişikliği gözlenmemiştir [643]. Yapılan bu çalışmada Clock, Bmal1, Rev-Erbα ve Per 2 gen düzeyleri ile glukoz arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir (Çizelge 4.21). Genlerin mRNA ekspresyon düzeylerindeki bir değişiklik serum glukoz düzeyini etkilememiştir.

Glukoz homeostazına benzer şekilde, uyku-uyanıklık ve beslenme-açlık döngüleri gibi davranışlarda lipid metabolizma dengesinin günlük ritimle uyumlu olduğu iyi bir şekilde belirtilmiştir. Clock'un lipid homeostazına dahil olduğuna dair kanıtlar, hipertrigliseridemi, daha yüksek lipid emilimi, yüksek serum kolesterolü ve azalmış insülin duyarlılığı gösteren saat bozulmasının genetik fare modellerinin metabolik fenotipinden gelmiştir [459]. PER2'ye bağlanan potansiyel dokuya özgü transkripsiyon faktörlerinin varlığı bildirilmiştir. Örneğin, PER2'nin beyaz yağ dokusunda PPARγ'yı doğrudan düzenlediği ve bunun da lipid metabolizmasının kontrolü ile sonuçlandığı gösterilmiştir [525]. Yapılan bir çalışma, Rev-Erbα'nın lipid homeostaz düzenleyicisi SREBP1C'yi ve hız sınırlayıcı enzimler Hmgcr ve Cyp7a1'i kontrol ederek kolesterol ve safra asidinin sirkadiyen modülasyonunda rol oynadığını belgelemiştir [435]. Yapılan başka bir çalışmada fruktozun, fosforile edilmiş AMP ile aktive olan protein kinaz (pAMPK)'ı bozduğu ve LIPIN1 seviyesini yükselttiği için hepatositlerde sirkadiyen ritmi bozduğu ve daha fazla yağ birikmesine yol açtığı bulunmuştur. Ancak fruktozun, yüksek pAMPK ve düşük LIPIN1 ve mikrozomal triaçilgliserol transfer proteini (MTTP) düzeyine yol açtığı için miyotüplerde daha sağlam ritimlere ve daha az yağ birikmesine yol açtığı bulunmuştur [644]. Yapılan bu çalışmada probiyotik grubunda Bmal1 gen ekspresyon düzeyi ile ALT arasında pozitif yönlü anlamlı bir korelasyon gözlenmiştir (Çizelge 4.19). Probiyotik grubunda Rev-Erbα gen ekspresyon düzeyi ile total kolesterol ve AST arasında negatif

korelasyon göstermiştir (Çizelge 4.20). Probiyotik grubunda Bmal1 gen ekspresyon seviyesi arttıkça ALT düzeyinin artması ile ALT'nin dengelenmesinde Bmal1 geninin rol oynadığı gözlemlenmektedir.

Aşırı şükroz alımı metabolik sendromun ana sebeplerinden biri olarak tanımlanmıştır. Şükrozun bir bileşeni olan fruktozun fazlalığından kaynaklanan toksisite, fizyolojik olarak metabolik substratın karaciğerde hızla *de novo* lipogenez içine akması (NAYKH'na öncülük eder) ve fruktozun proteinlerle glikasyona uğraması nedeniyle metabolik sendrom gelişimini sağlamaktadır [645]. Yapılan bu çalışmada kontrol grubu ve probiyotik grubunda Clock gen ekspresyon seviyesinin artması IL-6 ve IL-1 β seviyesinde artışa neden olmuştur (Çizelge 4.18). Kontrol grubunda Rev-Erb α gen ekspresyon seviyesinin artması da IL-1 β seviyesini arttırmıştır (Çizelge 4.20). Probiyotik grubunda Bmal1 gen ekspresyon seviyesinin artması IL-6 seviyesinde artışa neden olmuştur (Çizelge 4.19). Özellikle Clock gen ekspresyon seviyesi hem kontrol grubu hem de probiyotik grubunda inflamatuvar belirteçlerin artmasını sağlamıştır. Dolayısıyla gen ekspresyon düzeyinin artması inflamatuvar belirteçleri arttırarak vücutta hasar oluşumunda rol oynamaktadır. Akut ve kronik inflamatuvar durumlarındaki gen düzeylerinin değişimi konusundaki moleküler mekanizmaların daha fazla çalışma yapılarak aydınlatılması gerekmektedir.

Karaciğer saati ve lipid metabolizması; beslenme/açlık döngüleri [646] ve senkronizör olarak işlev gören insülin tarafından düzenlenmektedir [647]. Yapılan bu çalışmada YFD grubunda Per2 gen ekspresyon düzeyinin artması insülin düzeyinin artmasını sağlamıştır. (Çizelge 4.21). Melatoninin ritmik salgılanmasının, sirkadiyen ritimlerin sürüklenmesi ve günlük olayların zamanlaması için dahili bir eşzamanlayıcı olarak davrandığı belirtilmektedir [648]. Melatoninin, sirkadiyen aktivite ritimlerinde merkezi rol oynayan 7 α -hidroksipregnenolon sentezini düzenlediği rapor edilmiştir [649]. Melatonin gece boyunca salgılanmakta ve kan beyin bariyerini geçtiği için gece uykusu sırasında serebral sinir hücrelerinin oksidasyon bozukluklarına karşı koruyucu rolü bulunmaktadır [650]. Yapılan bir çalışmada sıçanlara melatonin uygulanmasının karaciğerde antioksidan enzimin günlük ritimlerinde yaşa bağlı değişiklikleri düzelttiği bulunmuştur [651]. Yapılan bu çalışmada ise Clock, Rev-Erb α ve Per2 gen düzeyleri ile melatonin seviyesi arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir (Çizelge 4.18) (Çizelge 4.20) (Çizelge 4.21). Gen düzeylerinin artması melatonin seviyesinin azalmasına neden olmuştur veya melatonin seviyesinin azalması gen ekspresyon seviyelerinin artmasını ve hasar oluşumunu

sağlamıştır. Sıçanlardan kan alma işleminin farklı zamanlarda yapılarak gece ve gündüz arasındaki farkın da eklendiği daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.





6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yüksek fruktozlu beslenme ile alkolik olmayan karaciğer yağlanması oluşturulan sıçanlarda probiyotik tedavisi uygulanırken sirkadiyen saatin rolünün araştırıldığı bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. Kontrol grubunun haftalık yem tüketim miktarı YFD ve YFD+probiyotik grubundan anlamlı olarak yüksektir ($p<0,05$).
2. Deneyin başı, ortası ve sonunda yapılan tüm ölçümlerde sıçanların beden kütle indeksi, Lee indeksi ve bel çevresi ölçümleri gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemektedir ($p<0,05$).
3. Kontrol grubunun karaciğer indeksi değeri YFD grubundan anlamlı olarak düşük çıkmıştır ($p<0,05$).
4. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğerinde sağlıklı hücre görünümü saptanmıştır. YFD grubunun sıçan karaciğerinde belirgin bir yağlanma gözlenmektedir. YFD+probiyotik grubunun sıçan karaciğerinde ise santral ven etrafında yağlanmada azalma gözlenmiştir.
5. YFD grubu ve YFD+probiyotik grubunun steatoz durumu kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek çıkmıştır ($p>0,05$).
6. YFD grubunun hepatoselüler balonlaşma skoru kontrol grubu ve YFD+probiyotik grubundan anlamlı olarak yüksek çıkmıştır ($p<0,05$).
7. YFD grubunun NAS skoru kontrol grubu ve YFD+probiyotik grubundan anlamlı olarak yüksek çıkmıştır ($p<0,05$). Kontrol grubunun NAS skoru, YFD+probiyotik grubundan anlamlı olarak düşük çıkmıştır ($p<0,05$).
8. Karaciğer organ ağırlığı ile steatoz ($r=0,630$; $p=0,001$), hepatoselüler balonlaşma ($r=0,604$; $p=0,002$) ve NAS skoru ($r=0,602$; $p=0,001$) arasında pozitif yönlü bir korelasyon gözlenmiştir.
9. Kontrol grubunun glikoz düzeyi YFD grubundan anlamlı bir şekilde düşüktür ($p<0,05$).
10. YFD+probiyotik grubunun total kolesterol değeri kontrol grubundan anlamlı olarak düşüktür ($p<0,05$).
11. YFD+probiyotik grubunun melatonin düzeyi kontrol grubu ve YFD grubundan anlamlı olarak düşük çıkmıştır ($p<0,05$).

12. Kontrol grubunun MDA değeri, YFD ve YFD+probiyotik grubundan anlamlı olarak düşük çıkmıştır ($p<0,05$).
13. Kontrol grubunun GSSG değeri, YFD ve YFD+probiyotik grubundan anlamlı olarak düşük çıkmıştır ($p<0,05$).
14. Kontrol grubunun GPx değeri, YFD grubundan anlamlı olarak düşük çıkmıştır ($p<0,05$).
15. Kontrol grubunun zonulin düzeyi ile melatonin seviyesi arasında negatif yönlü ($r=-0,762$; $p=0,028$) korelasyon bulunmuştur.
16. Kontrol grubunun zonulin düzeyi ile AST ($r=0,881$; $p=0,004$) ve ALT ($r=0,814$; $p=0,014$) düzeyi arasında pozitif yönlü korelasyon bulunmuştur.
17. YFD+probiyotik grubunun zonulin düzeyi ile sıçanların kesiminde elde edilen lee indeksi arasında pozitif yönlü bir korelasyon ($r=0,833$; $p=0,010$) bulunmuştur.
18. Zonulin seviyesi ile Bmal1 gen seviyesi ($r=-0,435$; $p=0,034$) ve YFD grubunun Bmal1 gen seviyesi ($r=-0,762$; $p=0,028$) arasında negatif yönlü bir korelasyon gözlenmiştir.
19. Lee indeksi YFD grubunda Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon ($r=0,714$; $p=0,047$) göstermiştir.
20. GSH seviyesi YFD+probiyotik grubunda Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon ($r=0,714$; $p=0,047$) göstermiştir.
21. GSSG seviyesi YFD+probiyotik grubu ($r=0,976$; $p=0,000$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=0,651$; $p=0,001$) Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon göstermiştir.
22. Diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde GSH/GSSG oranı ($r=-0,420$; $p=0,046$), total kolesterol ($r=-0,408$; $p=0,048$) ve melatonin seviyesi ($r=-0,431$; $p=0,035$) Clock gen ekspresyon seviyesi ile negatif korelasyon göstermiştir.
23. MDA seviyesi Clock gen ekspresyon seviyesi ile kontrol grubunda negatif korelasyon ($r=-0,762$; $p=0,028$), YFD+probiyotik ($r=0,786$; $p=0,021$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=0,534$; $p=0,007$) pozitif korelasyon göstermiştir.
24. GPx seviyesi YFD+probiyotik grubunda Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon ($r=0,738$; $p=0,037$) göstermiştir.

25. IL-6 seviyesi kontrol grubu ($r=0,810$; $p=0,015$) ve YFD+probiyotik ($r=0,826$; $p=0,011$) grubunda Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon göstermiştir.
26. IL-1 β seviyesi Clock gen ekspresyon seviyesi ile kontrol grubu ($r=0,743$; $p=0,035$), YFD+probiyotik ($r=0,731$; $p=0,040$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=0,618$; $p=0,001$) pozitif korelasyon göstermiştir.
27. GSSG ($r=0,786$; $p=0,021$), MDA ($r=0,714$; $p=0,047$), ALT ($r=0,738$; $p=0,037$) ve IL-6 ($r=0,726$; $p=0,011$) seviyesi Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon göstermiştir.
28. GGT seviyesi diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde Clock gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon ($r=0,495$; $p=0,014$) göstermiştir.
29. Melatonin seviyesi diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile negatif korelasyon ($r=-0,450$; $p=0,027$) göstermiştir.
30. GSH/GSSG oranı YFD grubunda Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile negatif korelasyon ($r=-0,762$; $p=0,028$) göstermiştir.
31. GSSG seviyesi Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile YFD grubunda ($r=0,786$; $p=0,021$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=0,443$; $p=0,034$) pozitif korelasyon göstermiştir.
32. MDA seviyesi Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile kontrol grubunda negatif korelasyon ($r=-0,738$; $p=0,037$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde pozitif korelasyon ($r=0,433$; $p=0,035$) göstermiştir.
33. Total kolesterol seviyesi Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile YFD+probiyotik grubunda ($r=-0,810$; $p=0,015$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=-0,447$; $p=0,029$) negatif korelasyon göstermiştir.
34. AST seviyesi Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile YFD+probiyotik grubunda ($r=-0,929$; $p=0,001$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=-0,470$; $p=0,021$) negatif korelasyon göstermiştir.
35. IL-1 β seviyesi Rev-Erba gen ekspresyon seviyesi ile kontrol grubunda ($r=0,850$; $p=0,007$) ve diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde ($r=0,427$; $p=0,037$) pozitif korelasyon göstermiştir.
36. GSSG seviyesi diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde Per2 gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon ($r=0,426$; $p=0,043$) göstermiştir.

37. Melatonin seviyesi diyet müdahale gruplarının toplamı değerlendirildiğinde Per2 gen ekspresyon seviyesi ile negatif korelasyon ($r=-0,410$; $p=0,047$) göstermiştir.
38. İnsülin seviyesi YFD grubunda Per2 gen ekspresyon seviyesi ile pozitif korelasyon ($r=0,762$; $p=0,028$) göstermiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda;

Fruktoz tüketimi sağlanan grupların yem ve su tüketimleri genel olarak kontrol grubundan düşük çıkmıştır. Ancak fruktozun sağladığı enerjiden dolayı ortalama enerji alımı fruktoz tüketen gruplarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek çıkmıştır. Enerji alımlarında anlamlı bir farklılık olmadığı için gruplardaki sıçanların BKİ, Lee indeksi ve bel çevresi ölçümlerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Yüksek fruktoz alan grubun steatoz, lobular inflamasyon ve NAS skoru değerleri kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek çıkmıştır. Probiyotik kullanımı ise NAS skoru değerinde ve dolayısıyla karaciğer yağlanması düzeyinde azalmaya neden olmuştur. Karaciğer ağırlığı da steatoz, lobular inflamasyon ve NAS skorları ile pozitif korelasyon göstermiştir. Yağlanma düzeyi arttıkça karaciğer ağırlığı ve karaciğer indeksi artmıştır. Ancak bu durum total kolesterol, AST, ALT ve GGT düzeylerine yansımamış, sadece YFD grubunun açlık kan glikozu değerinin kontrol grubuna göre yükselmesini sağlamıştır.

Fruktoz kullanımı oksidatif stresi arttırmış ve probiyotik kullanımı ile oksidatif stresin azaldığı ve yıkımın daha az olduğu gözlenmiştir. Sirkadiyen saat genlerinin mRNA düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ancak fruktoz tüketimi ile gen ekspresyon seviyelerinin arttığı ve LGG tedavisi ile bu seviyelerin azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla karaciğer hasarını önlemede fruktozun olumsuz etkisinin probiyotiğin bazı biyokimyasal ve genomik yollar üzerine etki ederek sirkadiyen ritmi modüle ettiği gözlenmiştir. Ayrıca melatonin hormonu da sirkadiyen saat gen ekspresyon seviyelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra sirkadiyen saat gen ekspresyon seviyelerinin artması oksidatif stres belirteçlerini de arttırmaktadır. Patogenezinde hem sirkadiyen ritim hem de oksidatif stres bileşenleri olan hastalıkların, her iki bileşeni hedef alan iki yönlü bir yaklaşımdan yararlanabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, antioksidanlardan ve sirkadiyen ritmi yeniden senkronize eden yaklaşımlardan (yani

melatonin) oluşan bir kombinatoryal yaklaşım, bu koşullara sahip hastalar için faydalı olabilir.

Sirkadiyen ritim araştırmasının mevcut durumuna ilişkin bir uyarı olarak, en yaygın kullanılan hayvan modelleri olan kemirgen modellerinin, özellikle insan tedavileri geliştirirken insanlarla doğrudan ilgili olabileceği veya olmayabileceğidir. Bunun nedeni fareler, sıçanlar ve hamsterlerin gece hayvanları olmalarıdır. Ancak bulguların çoğunun faza göre ayarlanabileceği de düşünülebilir. Bu çalışmada eşit koşullarda barınma imkanı sağlanan sıçanlarda sadece fruktoz uygulanarak bağırsakta ve karaciğerde hasar oluşturup tedavi etmeyi planlamıştık ancak bağırsak geçirgenliği belirteci olan zonulin düzeyinde gruplar arasında istenilen düzeyde bir farklılığın oluşmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte probiyotığın bağırsağı modüle ettiği düşünüldükte bazı sonuçlara varılmıştır. İlaveten zonulin düzeyinin yani bağırsak geçirgenliğinin artması melatonin seviyesinde düşüklüğe ve AST ve ALT değerlerinde yükselmeye neden olmuştur. Ayrıca sirkadiyen saat gen ekspresyon seviyelerinin artması inflamatuvar belirteçlerin de artmasını sağlamıştır. Bu durum bize fruktoz ile bazı histolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluştuğunu gösterirken diğer taraftan istenilen düzeyde belirgin bir etkinin oluşması için ya çalışma süresinin uzatılması gerektiğini veya sadece fruktoz değil ilaveten yüksek yağlı bir diyetin de uygulanabileceğini göstermektedir.

Öneri olarak, sirkadiyen ritim genlerinin mRNA düzeylerini gruplar arasında kıyaslarken sirkadiyen ritmi bozup bozmadığımızı da görebilmemiz için lokomotor aktivite testi de çalışmaya dahil edilebilir. Ayrıca bağırsaktaki hasarın gözlemlenebilmesi için bağırsak dokusunda da zonulin düzeyine bakılabilir ve gerekli kıyaslamalara gidilebilir. Suşa özgü olarak bu çalışma LGG'nin birçok mekanizmada etkili olduğu ve gen salınımlarını düzenleyebildiği gözlenmiştir. Diğer probiyotik mikroorganizmalar ile de bu çalışma tekrarlanarak bağırsak hasarının düzenlenmesinde, inflamasyonun ve oksidatif stresin azalmasında ve dolayısıyla karaciğer hasarının iyileştirilmesinde en iyi probiyotik seçimi için alternatif öneriler sunulabilir.

Çalışma sınırlılıkları

Sıçan sayılarının az olması çalışmanın birçok verisinin normal dağılıma sahip olmamasını ve dolayısıyla yapılacak istatistiksel yöntemleri etkilemiştir. Kafeslerde 2 sıçan bulundurulması hayvan başına yem ve su tüketimi ile enerji alımının hesaplanmasını ve dolayısıyla korelasyon analizlerini etkilemiştir. Fizyolojik ölçümlerin yapılması en az 2 kişi gerektirdiğinden vücut ağırlığı, boy uzunluğu ve bel çevresi ölçümleri haftalık olarak yapılamamıştır. Ayrıca sıçanlardaki yeterli kan düzeyine ulaşamayacağı için melatonin seviyesine gündüz ve gece periyotları yerine tek seferde bakılmıştır.



KAYNAKLAR

1. Albillos, A., de Gottardi, A., and Rescigno, M. (2020). The gut-liver in liver disease: Pathophysiological basis for therapy. *Journal of Hepatology*, 72(3), 558-577.
2. Porras, D., Nistal, E., Martínez-Flórez, S., Pisonero-Vaquero, S., Olcoz, J. L., Jover, R., González-Gallego, J., García-Mediavilla, M. V., and Sánchez-Campos, S. (2017). Protective effect of quercetin on high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice is mediated by modulating intestinal microbiota imbalance and related gut-liver axis activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 102, 188-202.
3. Mancini, A., Campagna, F., Amodio, P., and Tuohy, K. M. (2018). Gut: liver: brain axis: the microbial challenge in the hepatic encephalopathy. *Food & Function*, 9(3), 1373-1388.
4. Trivedi, P. J., and Adams, D. H. (2016). Gut–liver immunity. *Journal of Hepatology*, 64(5), 1187-1189.
5. Bajaj, J. S. (2019). Alcohol, liver disease and the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(4), 235-246.
6. Tilg, H., Cani, P. D., and Mayer, E. A. (2016). Gut microbiome and liver diseases. *Gut*, 65(12), 2035-2044.
7. Mokdad, A. A., Lopez, A. D., Shahrzad, S., Lozano, R., Mokdad, A. H., Stanaway, J., Murray, C. J. L., and Naghavi, M. (2014). Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Medicine*, 12(145), 1-24.
8. Tripathi, A., Debelius, J., Brenner, D. A., Karin, M., Lomba, R., Schnabl, B., and Knight, R. (2018). The gut–liver axis and the intersection with the microbiome. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15(7), 397-411.
9. Abenavoli, L., Greco, M., Milic, N., Accattato, F., Foti, D., Gulletta, E., and Luzzza, F. (2017). Effect of Mediterranean diet and antioxidant formulation in non-alcoholic fatty liver disease: a randomized study. *Nutrients*, 9(8), 870.
10. Spruss, A., and Bergheim, I. (2009). Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(9), 657-662.
11. Yilmaz, Y. (2012). Fructose in non- alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 35(10), 1135-1144.
12. Shi, D., Chen, J., Wang, J., Yao, J., Huang, Y., Zhang, G., and Bao, Z. (2019). Circadian clock genes in the metabolism of non-alcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Physiology*, 10, 423.

13. Filiano, A. N., Millender-Swain, T., Johnson Jr, R., Young, M. E., Gamble, K. L., and Bailey, S. M. (2013). Chronic ethanol consumption disrupts the core molecular clock and diurnal rhythms of metabolic genes in the liver without affecting the suprachiasmatic nucleus. *PloS one*, 8(8), e71684.
14. Suk, K. T., and Kim, D. J. (2019). Gut microbiota: novel therapeutic target for nonalcoholic fatty liver disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 13(3), 193-204.
15. Kwon, J. H., Lee, H. G., Seo, K. H., and Kim, H. (2019). Combination of whole grapeseed flour and newly isolated kefir lactic acid bacteria reduces high- fat-induced hepatic steatosis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(4), 1801040.
16. Milosevic, I., Vujovic, A., Barac, A., Djelic, M., Korac, M., Radovanovic Spurnic, A., Gmizic, I., Stevanovic, O., Djordjevic, V., Lekic, N., Russo, E., and Amedei, A. (2019). Gut-liver axis, gut microbiota, and its modulation in the management of liver diseases: a review of the literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 395.
17. Tan, X., Li, L., Wang, J., Zhao, B., Pan, J., Wang, L., Liu, X., Liu, X., and Liu, Z. (2019). Resveratrol prevents acrylamide-induced mitochondrial dysfunction and inflammatory responses via targeting circadian regulator Bmal1 and Cry1 in hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(31), 8510-8519.
18. Li, J., Wei, L., Zhao, C., Li, J., Liu, Z., Zhang, M., and Wang, Y. (2019). Resveratrol maintains lipid metabolism homeostasis via one of the mechanisms associated with the key circadian regulator Bmal1. *Molecules*, 24(16), 2916.
19. Mi, Y., Qi, G., Fan, R., Ji, X., Liu, Z., and Liu, X. (2017). EGCG ameliorates diet-induced metabolic syndrome associating with the circadian clock. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(6), 1575-1589.
20. Xie, X., Guo, A., Wu, T., Hu, Q., Huang, L., Yao, C., Zhao, B., Zhang, W., Chi, B., Lu, P., Zhao, Z., and Fu, Z. (2017). Preventive effect of L-carnitine on the disorder of lipid metabolism and circadian clock of mice subjected to chronic jet-lag. *Physiological Research*, 66(5), 801-810.
21. Kennedy, P., Wagner, M., Castéra, L., Hong, C. W., Johnson, C. L., Sirlin, C. B., and Taouli, B. (2018). Quantitative elastography methods in liver disease: current evidence and future directions. *Radiology*, 286(3), 738-763.
22. Maurice, J., and Manousou, P. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical medicine*, 18(3), 245-250.
23. Sheka, A. C., Adeyi, O., Thompson, J., Hameed, B., Crawford, P. A., and Ikramuddin, S. (2020). Nonalcoholic steatohepatitis: a review. *Jama*, 323(12), 1175-1183.
24. Younossi, Z. M., Marchesini, G., Pinto-Cortez, H., and Petta, S. (2019). Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis: implications for liver transplantation. *Transplantation*, 103(1), 22-27.

25. Mouries, J., Brescia, P., Silvestri, A., Spadoni, I., Sorribas, M., Wiest, R., Erika, M., Galbiati, M., Invernizzi, P., Adorini, L., Penna, G., Rescigno, M. (2019). Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *Journal of Hepatology*, 71(6), 1216-1228.
26. Mouzaki, M., Comelli, E. M., Arendt, B. M., Bonengel, J., Fung, S. K., Fischer, S. E., McGilvray, I. D., and Allard, J. P. (2013). Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 58(1), 120-127.
27. Konturek, P. C., Harsch, I. A., Konturek, K., Schink, M., Konturek, T., Neurath, M. F., and Zopf, Y. (2018). Gut–liver axis: how do gut bacteria influence the liver?. *Medical Sciences*, 6(3), 79.
28. Gao, B., Ahmad, M. F., Nagy, L. E., and Tsukamoto, H. (2019). Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 70(2), 249-259.
29. Choi, Y., Abdelmegeed, M. A., and Song, B. J. (2018). Preventive effects of indole-3-carbinol against alcohol-induced liver injury in mice via antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic mechanisms: Role of gut-liver-adipose tissue axis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 55, 12-25.
30. Seitz, H. K., Bataller, R., Cortez-Pinto, H., Gao, B., Gual, A., Lackner, C., Mathurin, P., Mueller, S., Szabo, G., and Tsukamoto, H. (2018). Alcoholic liver disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-22.
31. Rehm, J., Mathers, C., Popova, S., Thavorncharoensap, M., Teerawattananon, Y., and Patra, J. (2009). Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *The Lancet*, 373(9682), 2223-2233.
32. Stickel, F., Datz, C., Hampe, J., and Bataller, R. (2017). Pathophysiology and management of alcoholic liver disease: update 2016. *Gut and Liver*, 11(2), 173-188.
33. Weissenborn, K. (2019). Hepatic encephalopathy: definition, clinical grading and diagnostic principles. *Drugs*, 79(1), 5-9.
34. Pericleous, M., Sarnowski, A., Moore, A., Fijten, R., and Zaman, M. (2016). The clinical management of abdominal ascites, spontaneous bacterial peritonitis and hepatorenal syndrome: a review of current guidelines and recommendations. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 28(3), e10-e18.
35. Tergast, T. L., Wranke, A., Laser, H., Gerbel, S., Manns, M. P., Cornberg, M., and Maasoumy, B. (2018). Dose- dependent impact of proton pump inhibitors on the clinical course of spontaneous bacterial peritonitis. *Liver International*, 38(9), 1602-1613.
36. Ganne-Carrié, N., and Nahon, P. (2019). Hepatocellular carcinoma in the setting of alcohol-related liver disease. *Journal of Hepatology*, 70(2), 284-293.

37. Wan, M. L. Y., and El-Nezami, H. (2018). Targeting gut microbiota in hepatocellular carcinoma: probiotics as a novel therapy. *Hepatobiliary surgery and nutrition*, 7(1), 11-20.
38. Yuen, M. F., Chen, D. S., Dusheiko, G. M., Janssen, H. L. A., Lau, D. T. Y., Locarnini, S. A., Peters, M. G., and Lai, C. L. (2018). Hepatitis B virus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-20.
39. Kasap, B., Buruk, C. K., Kaklıkkaya, N., Özkaya, E., Aydın Kasap Z., and Aydın, F. (2020). Comparison of mRNA Levels of Stimulator of Interferon Genes (STING) in Individuals with Natural Immunity to Hepatitis B Virus (HBV), and in those with Chronic Hepatitis B Infection and without HBV. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 54(1), 66-78.
40. Tuyji Tok, Y., Şener, A. G., Gökmen, A. A., Demirdal, T., and Kaya, S. (2020). Investigation of Regulatory T Cells and Secreted Immunomodulatory Cytokine IL-10 Levels in Patients with Hepatitis B. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 54(2), 266-278.
41. Manns, M. P., Buti, M., Gane, E., Pawlotsky, J. M., Razavi, H., Terrault, N., and Younossi, Z. (2017). Hepatitis C virus infection. *Nature reviews Disease Primers*, 3(1), 1-19.
42. Cacoub, P., and Comarmond, C. (2019, March). Considering hepatitis C virus infection as a systemic disease. In *Seminars in dialysis*, 32(2), 99-107.
43. Kuna, L., Jakab, J., Smolic, R., Wu, G. Y., and Smolic, M. (2019). HCV extrahepatic manifestations. *Journal of clinical and translational hepatology*, 7(2), 172-182.
44. Wilde, B., and Katsounas, A. (2019). Immune dysfunction and albumin-related immunity in liver cirrhosis. *Mediators of Inflammation*, 2019.
45. Acharya, C., Sahingur, S. E., and Bajaj, J. S. (2017). Microbiota, cirrhosis, and the emerging oral-gut-liver axis. *JCI Insight*, 2(19):e94416.
46. Alexopoulou, A., Agiasotelli, D., Vasilieva, L. E., and Dourakis, S. P. (2017). Bacterial translocation markers in liver cirrhosis. *Annals of Gastroenterology*, 30(5), 486-497.
47. Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73-84.
48. Younossi, Z. M. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease—A global public health perspective. *Journal of Hepatology*, 70(3), 531-544.
49. Cobbina, E., and Akhlaghi, F. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)—pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metabolism Reviews*, 49(2), 197-211.
50. Sweet, P. H., Khoo, T., and Nguyen, S. (2017). Nonalcoholic fatty liver disease. *Primary Care*, 44(4), 599-607.

51. Milić, S., Lulić, D., and Štimac, D. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World Journal of Gastroenterology*, 20(28), 9330-9337.
52. Lonardo, A., Nascimbeni, F., Ballestri, S., Fairweather, D., Win, S., Than, T. A., Abdelmalek, M. F., and Suzuki, A. (2019). Sex differences in nonalcoholic fatty liver disease: state of the art and identification of research gaps. *Hepatology*, 70(4), 1457-1469.
53. Venetsanaki, V., and Polyzos, S. A. (2019). Menopause and non-alcoholic fatty liver disease: a review focusing on therapeutic perspectives. *Current Vascular Pharmacology*, 17(6), 546-555.
54. Ministrini, S., Montecucco, F., Sahebkar, A., and Carbone, F. (2020). Macrophages in the pathophysiology of NAFLD: The role of sex differences. *European Journal of Clinical Investigation*, 50(6), e13236.
55. Byrne, C. D., and Targher, G. (2015). NAFLD: a multisystem disease. *Journal of Hepatology*, 62(1), S47-S64.
56. Hossain, N., Afendy, A., Stepanova, M., Nader, F., Srishord, M., Rafiq, N., Goodman, Z., and Younossi, Z. (2009). Independent predictors of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(11), 1224-1229.
57. Adams, L. A., Lymp, J. F., Sauver, J. S., Sanderson, S. O., Lindor, K. D., Feldstein, A., and Angulo, P. (2005). The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology*, 129(1), 113-121.
58. Singh, S., Allen, A. M., Wang, Z., Prokop, L. J., Murad, M. H., and Loomba, R. (2015). Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(4), 643-654.
59. Petta, S., Gastaldelli, A., Rebelos, E., Bugianesi, E., Messa, P., Miele, L., Svegliati-Baroni, G., Valenti, L., and Bonino, F. (2016). Pathophysiology of non alcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2082.
60. Peverill, W., Powell, L. W., and Skoien, R. (2014). Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8591-8638.
61. Buzzetti, E., Pinzani, M., and Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, 65(8), 1038-1048.
62. Aqel, B., and DiBaise, J. K. (2015). Role of the gut microbiome in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition in Clinical Practice*, 30(6), 780-786.

63. Huang, T., Behary, J., and Zekry, A. (2020). Non- alcoholic fatty liver disease: a review of epidemiology, risk factors, diagnosis and management. *Internal Medicine Journal*, 50(9), 1038-1047.
64. Fang, Y. L., Chen, H., Wang, C. L., and Liang, L. (2018). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease in children and adolescence: From “two hit theory” to “multiple hit model”. *World Journal of Gastroenterology*, 24(27), 2974-2983.
65. Petersen, M. C., and Shulman, G. I. (2017). Roles of diacylglycerols and ceramides in hepatic insulin resistance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(7), 649-665.
66. Shulman, G. I. (2014). Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *New England Journal of Medicine*, 371(12), 1131-1141.
67. Musso, G., Gambino, R., and Cassader, M. (2013). Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 175-191.
68. Ferramosca, A., and Zara, V. (2014). Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World Journal of Gastroenterology*, 20(7), 1746-1755.
69. Tsochatzis, E. A., Papatheodoridis, G. V., and Archimandritis, A. J. (2009). Adipokines in nonalcoholic steatohepatitis: from pathogenesis to implications in diagnosis and therapy. *Mediators of Inflammation*, 2009.
70. Colica, C., and Abenavoli, L. (2018). Resistin levels in non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Journal of Translational Internal Medicine*, 6(1), 52-53.
71. Makino, T., Noguchi, Y., Yoshikawa, T., Doi, C., and Nomura, K. (1998). Circulating interleukin 6 concentrations and insulin resistance in patients with cancer. *Journal of British Surgery*, 85(12), 1658-1662.
72. Fernandez-Real, J. M., Vayreda, M., Richart, C., Gutierrez, C., Broch, M., Vendrell, J., and Ricart, W. (2001). Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(3), 1154-1159.
73. Shabalala, S. C., Dlodla, P. V., Mabasa, L., Kappo, A. P., Basson, A. K., Pfeiffer, C., and Johnson, R. (2020). The effect of adiponectin in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the potential role of polyphenols in the modulation of adiponectin signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110785.
74. Tilg, H., and Hotamisligil, G. S. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease: cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology*, 131(3), 934-945.
75. Bugianesi, E., Pagotto, U., Manini, R., Vanni, E., Gastaldelli, A., de Iasio, R., Gentilcore, E., Natale, S., Cassader, M., Rizzetto, M., Pasquali, R., and Marchesini, G. (2005). Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(6), 3498-3504.

76. Tomas, E., Tsao, T. S., Saha, A. K., Murrey, H. E., cheng Zhang, C., Itani, S. I., Lodish, H. F., and Ruderman, N. B. (2002). Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: Acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16309-16313.
77. Tilg, H., and Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 772-783.
78. Kakuma, T., Lee, Y., Higa, M., Wang, Z. W., Pan, W., Shimomura, I., and Unger, R. H. (2000). Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8536-8541.
79. Wang, J., Leclercq, I., Brymora, J. M., Xu, N., Ramezani-Moghadam, M., London, R. M., Brigstock, D., and George, J. (2009). Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis. *Gastroenterology*, 137(2), 713-723.
80. Tsochatzis, E., Papatheodoridis, G. V., and Archimandritis, A. J. (2006). The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *American Journal of Gastroenterology*, 101(11), 2629-2640.
81. Acquarone, E., Monacelli, F., Borghi, R., Nencioni, A., and Odetti, P. (2019). Resistin: a reappraisal. *Mechanisms of Ageing and Development*, 178, 46-63.
82. Gieriej, P., Gieriej, B., Kalinowski, P., Wróblewski, T., Paluszkiewicz, R., Kobryń, K., and Ziarkiewicz-Wróblewska, B. (2017). Expression of resistin in the liver of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Polish Journal of Pathology*, 68(3), 225-233.
83. Jamali, R., Razavizade, M., Arj, A., and Aarabi, M. H. (2016). Serum adipokines might predict liver histology findings in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 22(21), 5096-5103.
84. Mousavi, Z., Ganji, A., Tehrani, D. F., Bahari, A., EsmaeilZadeh, A., and Delghandi, M. (2017). Correlation of visfatin level with non-alcoholic fatty liver in metabolic syndrome. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 31, 28.
85. Aller, R., De Luis, D. A., Izaola, O., Sagrado, M. G., Conde, R., Velasco, M. C., Alvarez, T., Pacheco, D., and González, J. M. (2009). Influence of visfatin on histopathological changes of non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(8), 1772-1777.
86. Crespo, J., Fern, P., Hern, M., Mayorga, M., and Pons-Romero, F. (2001). Gene expression of tumor necrosis factor [alpha] and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology*, 34(6), 1158-1163.

87. Jin, R., Krasinskas, A., Le, N.-A., Konomi, J. V., Holzberg, J., Romero, R., and Vos, M. B. (2018). Association between plasminogen activator inhibitor- 1 and severity of liver injury and cardiovascular risk in children with non- alcoholic fatty liver disease. *Pediatric Obesity*, 13(1), 23-29.
88. Espino, A., Villagrán, A., Vollrath, V., Hanckes, P., Salas, R., Farah, A., Solis, N., Pizarro, M., Escalona, A., Boza, C., Perez, G., Carrasco, G., Padilla, O., Miquel, J. F., Nervi, F., Chavez-Tapia, N. C., Arab, J. P., Alvarez-Lobos, M., Arrese, M., and Riquelme, A. (2016). Plasminogen activator inhibitor type 1 serum levels and 4G/5G gene polymorphism in morbidly obese Hispanic patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology*, 10(4), 493-501.
89. Tanaka, N., Kimura, T., Fujimori, N., Nagaya, T., Komatsu, M., Tanaka, E. (2019). Current status, problems, and perspectives of non-alcoholic fatty liver disease research. *World Journal of Gastroenterology*, 25(2), 163-177.
90. Gan, L. T., Van Rooyen, D. M., Koina, M. E., McCuskey, R. S., Teoh, N. C., and Farrell, G. C. (2014). Hepatocyte free cholesterol lipotoxicity results from JNK1-mediated mitochondrial injury and is HMGB1 and TLR4-dependent. *Journal of Hepatology*, 61(6), 1376-1384.
91. Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E., and Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481(7381), 278-286.
92. Watanabe, A., Sohail, M. A., Gomes, D. A., Hashmi, A., Nagata, J., Sutterwala, F. S., Mahmood, S., Jhanler, M. N., Flavell, R. A., and Mehal, W. Z. (2009). Inflammasome-mediated regulation of hepatic stellate cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(6), G1248-G1257.
93. Miura, K., Kodama, Y., Inokuchi, S., Schnabl, B., Aoyama, T., Ohnishi, H., Olefsky, J. M., Brenner, D. A., and Seki, E. (2010). Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1 β in mice. *Gastroenterology*, 139(1), 323-334.
94. Borrelli, A., Bonelli, P., Tuccillo, F. M., Goldfine, I. D., Evans, J. L., Buonaguro, F. M., and Mancini, A. (2018). Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma: Current and innovative therapeutic approaches. *Redox Biology*, 15, 467-479.
95. Ashraf, N. U., and Sheikh, T. A. (2015). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Free Radical Research*, 49(12), 1405-1418.
96. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., and Petrosillo, G. (2014). Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 20(39), 14205-14218.
97. Pessayre, D., and Fromenty, B. (2005). NASH: a mitochondrial disease. *Journal of Hepatology*, 42(6), 928-940.

98. Makkonen, J., Pietiläinen, K. H., Rissanen, A., Kaprio, J., and Yki-Järvinen, H. (2009). Genetic factors contribute to variation in serum alanine aminotransferase activity independent of obesity and alcohol: a study in monozygotic and dizygotic twins. *Journal of Hepatology*, 50(5), 1035-1042.
99. Loomba, R., Schork, N., Chen, C. H., Bettencourt, R., Bhatt, A., Ang, B., Nyugen, P., Hernandez, C., Richards, L., Salotti, J., Lin, S., Seki, E., Nelson, K. E., Sirlin, C. B., Brenner, D. and Genetics of NAFLD in Twins Consortium. (2015). Heritability of hepatic fibrosis and steatosis based on a prospective twin study. *Gastroenterology*, 149(7), 1784-1793.
100. Long, M. T., Gurary, E. B., Massaro, J. M., Ma, J., Hoffmann, U., Chung, R. T., Benjamin, E. J., and Loomba, R. (2019). Parental non- alcoholic fatty liver disease increases risk of non- alcoholic fatty liver disease in offspring. *Liver International*, 39(4), 740-747.
101. Guerrero, R., Vega, G. L., Grundy, S. M., and Browning, J. D. (2009). Ethnic differences in hepatic steatosis: an insulin resistance paradox?. *Hepatology*, 49(3), 791-801.
102. Valenti, L. V. C., and Baselli, G. A. (2018). Genetics of nonalcoholic fatty liver disease: A 2018 update. *Current Pharmaceutical Design*, 24(38), 4566-4573.
103. Romeo, S., Kozlitina, J., Xing, C., Pertsemlidis, A., Cox, D., Pennacchio, L. A., Boerwinkle, E., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2008). Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics*, 40(12), 1461-1465.
104. Nobili, V., Liccardo, D., Bedogni, G., Salvatori, G., Gnani, D., Bersani, I., Alisi, A., Valenti, L., and Raponi, M. (2014). Influence of dietary pattern, physical activity, and I148M PNPLA3 on steatosis severity in at-risk adolescents. *Genes & Nutrition*, 9(3), 392.
105. Stender, S., Kozlitina, J., Nordestgaard, B. G., Tybjaerg-Hansen, A., Hobbs, H. H., and Cohen, J. C. (2017). Adiposity amplifies the genetic risk of fatty liver disease conferred by multiple loci. *Nature Genetics*, 49(6), 842-847.
106. BasuRay, S., Smagris, E., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2017). The PNPLA3 variant associated with fatty liver disease (I148M) accumulates on lipid droplets by evading ubiquitylation. *Hepatology*, 66(4), 1111-1124.
107. Luukkainen, P. K., Zhou, Y., Haridas, N., Dwivedi, O. P., Hyötyläinen, T., Ali, A., Juuti, A., Leivonen, M., Tukiainen, T., Ahonen, L., Scott, E., Palmer, J. M., Arola, J., Orho-Melander, M., and Vikman, P. (2017). Impaired hepatic lipid synthesis from polyunsaturated fatty acids in TM6SF2 E167K variant carriers with NAFLD. *Journal of Hepatology*, 67(1), 128-136.

108. Kim, D. S., Jackson, A. U., Li, Y. K., Stringham, H. M., Kuusisto, J., Kangas, A. J., Soinen, P., Ala-Korpela, M., Burant, C. F., Salomaa, V., Boehnke, M., Laakso, M., and Speliotes, E. K. (2017). Novel association of TM6SF2 rs58542926 genotype with increased serum tyrosine levels and decreased apoB-100 particles in Finns. *Journal of Lipid Research*, 58(7), 1471-1481.
109. Mancina, R. M., Dongiovanni, P., Petta, S., Pingitore, P., Meroni, M., Rametta, R., Borén, J., Montalcini, T., Pujia, A., Wiklund, O., Hindy, G., Spagnuolo, R., Motta, B. M., Pipitone, R. M., Craxi, A., Fargion, S., Nobili, V., Kakela, P., Karja, V., Mannisto, V., Pihlajamaki, J., Reilly, D. F., Castro-Perez, J., Kozlitina, J., Valenti, L., and Romeo, S. (2016). The MBOAT7-TMC4 variant rs641738 increases risk of nonalcoholic fatty liver disease in individuals of European descent. *Gastroenterology*, 150(5), 1219-1230.e6.
110. Petta, S., Miele, L., Bugianesi, E., Camma, C., Rosso, C., Boccia, S., Cabibi, D., Marco, V. D., Grimaudo, S., Grieco, A., Pipitone, R. M., Marchesini, G., and Craxi, A. (2014). Glucokinase regulatory protein gene polymorphism affects liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*, 9(2), e87523.
111. Dongiovanni, P., Meroni, M., Mancina, R. M., Baselli, G., Rametta, R., Pelusi, S., Männistö, V., Fracanzani, A. L., Badiali, S., Miele, L., Grimaudo, S., Petta, S., Bugianesi, E., Soardo, G., Fargion, S., Pihlajamaki, J., Romeo, S., and Valenti, L. (2018). Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3B gene variation protects against hepatic fat accumulation and fibrosis in individuals at high risk of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Communications*, 2(6), 666-675.
112. Valenti, L., Motta, B. M., Alisi, A., Sartorelli, R., Buonaiuto, G., Dongiovanni, P., Rametta, R., Pelusi, S., Fargion, S., and Nobili, V. (2012). LPIN1 rs13412852 polymorphism in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(5), 588-593.
113. Fares, R., Petta, S., Lombardi, R., Grimaudo, S., Dongiovanni, P., Pipitone, R., Rametta, R., Fracanzani, A. L., Mozzi, E., Craxi, A., Fargion, S., Sesti, G., and Valenti, L. (2015). The UCP 2- 866 G> A promoter region polymorphism is associated with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver International*, 35(5), 1574-1580.
114. Al-Serri, A., Anstee, Q. M., Valenti, L., Nobili, V., Leathart, J. B. S., Dongiovanni, P., Patch, J., Fracanzani, A., Fargion, S., Day, C. P., and Daly, A. K. (2012). The SOD2 C47T polymorphism influences NAFLD fibrosis severity: evidence from case-control and intra-familial allele association studies. *Journal of Hepatology*, 56(2), 448-454.
115. Eslam, M., Valenti, L., and Romeo, S. (2018). Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: clinical impact. *Journal of Hepatology*, 68(2), 268-279.
116. Stols-Gonçalves, D., Tristão, L. S., Henneman, P., and Nieuwdorp, M. (2019). Epigenetic markers and microbiota/metabolite-induced epigenetic modifications in the pathogenesis of obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and non-alcoholic fatty liver disease. *Current Diabetes Reports*, 19(31), 1-9.

117. Kitamoto, T., Kitamoto, A., Ogawa, Y., Honda, Y., Imajo, K., Saito, S., Yoneda, M., Nakamura, T., Nakajima, A., and Hotta, K. (2015). Targeted-bisulfite sequence analysis of the methylation of CpG islands in genes encoding PNPLA3, SAMM50, and PARVB of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 63(2), 494-502.
118. Pirola, C. J., Gianotti, T. F., Burgueño, A. L., Rey-Funes, M., Loidl, C. F., Mallardi, P., Martino, J. S., Castaño, G. O., and Sookoian, S. (2013). Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut*, 62(9), 1356-1363.
119. Hotta, K., Kitamoto, T., Kitamoto, A., Ogawa, Y., Honda, Y., Kessoku, T., Yoneda, M., Imajo, K., Tomeno, W., Saito, S., and Nakajima, A. (2018). Identification of the genomic region under epigenetic regulation during non- alcoholic fatty liver disease progression. *Hepatology Research*, 48(3), E320-E334.
120. Berná, G., and Romero- Gomez, M. (2020). The role of nutrition in non- alcoholic fatty liver disease: Pathophysiology and management. *Liver International*, 40(Suppl 1), 102-108.
121. Ullah, R., Rauf, N., Nabi, G., Ullah, H., Shen, Y., Zhou, Y. D., and Fu, J. (2019). Role of nutrition in the pathogenesis and prevention of non-alcoholic fatty liver disease: recent updates. *International Journal of Biological Sciences*, 15(2), 265-276.
122. Pickett-Blakely, O., Young, K., and Carr, R. M. (2018). Micronutrients in nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 6(4), 451-462.
123. Liu, Y., Chen, H., Wang, J., Zhou, W., Sun, R., and Xia, M. (2015). Association of serum retinoic acid with hepatic steatosis and liver injury in nonalcoholic fatty liver disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 102(1), 130-137.
124. Ter Horst, K. W., and Serlie, M. J. (2017). Fructose consumption, lipogenesis, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, 9(9), 981.
125. Franko, A., Merkel, D., Kovarova, M., Hoene, M., Jaghutriz, B. A., Heni, M., Königsrainer, A., Papan, C., Lehr, S., Haring, H.-U., and Peter, A. (2018). Dissociation of fatty liver and insulin resistance in I148M PNPLA3 carriers: differences in diacylglycerol (DAG) FA18: 1 lipid species as a possible explanation. *Nutrients*, 10(9), 1314.
126. Csak, T., Ganz, M., Pespisa, J., Kodys, K., Dolganiuc, A., and Szabo, G. (2011). Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology*, 54(1), 133-144.
127. Bozzetto, L., Prinster, A., Annuzzi, G., Costagliola, L., Mangione, A., Vitelli, A., Mazzeella, R., Longobardo, M., Mancini, M., Vigorito, C., Riccardi, G., and Rivellesse, A. A. (2012). Liver fat is reduced by an isoenergetic MUFA diet in a controlled randomized study in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 35(7), 1429-1435.

128. Datz, C., Müller, E., and Aigner, E. (2016). Iron overload and non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinologica*, 42(2), 173-183.
129. Britton, L. J., Subramaniam, V. N., and Crawford, D. H. G. (2016). Iron and non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 22(36), 8112-8122.
130. Jensen, T., Abdelmalek, M. F., Sullivan, S., Nadeau, K. J., Green, M., Roncal, C., Nakagawa, T., Kuwabara, M., Sato, Y., Kang, D.-H., Tolan, D. R., Sanchez-Lozada, L. G., Rosen, H. R., Lanaspa, M. A., Diehl, A. M., and Johnson, R. J. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 68(5), 1063-1075.
131. Bergheim, I., Weber, S., Vos, M., Krämer, S., Volynets, V., Kaserouni, S., McClain, C. J., and Bischoff, S. C. (2008). Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *Journal of Hepatology*, 48(6), 983-992.
132. Zivkovic, A. M., German, J. B., and Sanyal, A. J. (2007). Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(2), 285-300.
133. Lanaspa, M. A., Sanchez-Lozada, L. G., Choi, Y. J., Cicerchi, C., Kanbay, M., Roncal-Jimenez, C. A., Ishimoto, T., Li, N., Marek, G., Duranay, M., Schreiner, G., Rodriguez-Iturbe, B., Nakagawa, T., Kang, D.-H., Sautin, Y. Y., and Johnson, R. J. (2012). Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress: potential role in fructose-dependent and-independent fatty liver. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40732-40744.
134. Mäenpää, P. H., Raivio, K. O., and Kekomäki, M. P. (1968). Liver Adenine Nuldeotides: Fructose-Induced Depletion and Its Effect on Protein Synthesis. *Science*, 161(3847), 1253-1254.
135. Choi, Y. J., Shin, H. S., Choi, H. S., Park, J. W., Jo, I., Oh, E.-S., Lee, K.-Y., Lee, B.-H., Johnson, R.-J., and Kang, D.-H. (2014). Uric acid induces fat accumulation via generation of endoplasmic reticulum stress and SREBP-1c activation in hepatocytes. *Laboratory Investigation*, 94(10), 1114-1125.
136. Lim, J. S., Mietus-Snyder, M., Valente, A., Schwarz, J. M., and Lustig, R. H. (2010). The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7(5), 251-264.
137. Softic, S., Cohen, D. E., and Kahn, C. R. (2016). Role of dietary fructose and hepatic de novo lipogenesis in fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(5), 1282-1293.
138. Faeh, D., Minehira, K., Schwarz, J. M., Periasamy, R., Park, S., and Tappy, L. (2005). Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes*, 54(7), 1907-1913.

139. Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L., Griffen, S. C., Bremer, A. A., Graham, J. L., Hatcher, B., Cox, C. L., Dyachenko, A., Zhang, W., McGahan, J. P., Seibert, A., Krauss, R. M., Chiu, S., Schaefer, E. J., Ai, M., Otokozawa, S., Nakajima, K., Nakano, T., Beysen, C., Hellerstein, M. K., Berglund, L., and Havel, P. J. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1322-1334.
140. Cox, C. L., Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Graham, J. L., Hatcher, B., Griffen, S. C., Bremer, A. A., Berglund, L., McGahan, J. P., Havel, P. J., and Keim, N. L. (2012). Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks reduces net fat oxidation and energy expenditure in overweight/obese men and women. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(2), 201-208.
141. Lanaspá, M. A., Cicerchi, C., García, G., Li, N., Roncal-Jimenez, C. A., Rivard, C. J., Hunter, B., Andres-Hernando, A., Ishimoto, T., Sanchez-Lozada, L. G., Thomas, J., Hodges, R. S., Mant, C. T., and Johnson, R. J. (2012). Counteracting roles of AMP deaminase and AMP kinase in the development of fatty liver. *PloS one*, 7(11), e48801.
142. Schwarz, J. M., Acheson, K. J., Tappy, L., Piolino, V., Muller, M. J., Felber, J. P., and Jéquier, E. (1992). Thermogenesis and fructose metabolism in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 262(5), E591-E598.
143. Mizobe, T., Nakajima, Y., Ueno, H., and Sessler, D. I. (2006). Fructose administration increases intraoperative core temperature by augmenting both metabolic rate and the vasoconstriction threshold. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 104(6), 1124-1130.
144. Willebrords, J., Pereira, I. V. A., Maes, M., Yanguas, S. C., Colle, I., Van Den Bossche, B., Da Silva, T. C., de Oliveira, C.P. M., Andraus, W., Alves, V. A. F., Cogliati, B., and Vinken, M. (2015). Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research. *Progress in Lipid Research*, 59, 106-125.
145. Abdelmalek, M. F., Suzuki, A., Guy, C., Unalp-Arida, A., Colvin, R., Johnson, R. J., and Diehl, A. M., Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. (2010). Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 51(6), 1961-1971.
146. Petta, S., Marchesini, G., Caracausi, L., Macaluso, F. S., Cammà, C., Ciminnisi, S., Cabibi, D., Porcasi, R., Craxi, A., and Di Marco, V. (2013). Industrial, not fruit fructose intake is associated with the severity of liver fibrosis in genotype 1 chronic hepatitis C patients. *Journal of Hepatology*, 59(6), 1169-1176.
147. Ma, J., Fox, C. S., Jacques, P. F., Speliotes, E. K., Hoffmann, U., Smith, C. E., Saltzman, E., and McKeown, N. M. (2015). Sugar-sweetened beverage, diet soda, and fatty liver disease in the Framingham Heart Study cohorts. *Journal of Hepatology*, 63(2), 462-469.

148. Lê, K. A., and Bortolotti, M. (2008). Role of dietary carbohydrates and macronutrients in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11(4), 477-482.
149. Johnson, R. J., Rivard, C., Lanaspa, M. A., Otabachian-Smith, S., Ishimoto, T., Cicerchi, C., Cheeke, P. R., McIntosh, B., and Hess, T. (2013). Fructokinase, fructans, intestinal permeability, and metabolic syndrome: an equine connection?. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(2), 120-126.
150. Thuy, S., Ladurner, R., Volynets, V., Wagner, S., Strahl, S., Königsrainer, A., Maier, K.-P., Bischoff, S. C., and Bergheim, I. (2008). Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *The Journal of Nutrition*, 138(8), 1452-1455.
151. Gao, X., Fan, J. G., and Study Group of Liver and Metabolism, Chinese Society of Endocrinology. (2013). Diagnosis and management of non- alcoholic fatty liver disease and related metabolic disorders: Consensus statement from the Study Group of Liver and Metabolism, Chinese Society of Endocrinology. *Journal of Diabetes*, 5(4), 406-415.
152. Fracanzani, A. L., Valenti, L., Bugianesi, E., Andreoletti, M., Colli, A., Vanni, E., Bertelli, C., Fatta, E., Bignamini, D., Marchesini, G., and Fargion, S. (2008). Risk of severe liver disease in nonalcoholic fatty liver disease with normal aminotransferase levels: a role for insulin resistance and diabetes. *Hepatology*, 48(3), 792-798.
153. Mathiesen, U. L., Franzen, L. E., Frydén, A., Foberg, U., and Bodemar, G. (1999). The clinical significance of slightly to moderately increased liver transaminase values in asymptomatic patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34(1), 85-91.
154. Thamer, C., Tschritter, O., Haap, M., Shirkavand, F., Machann, J., Fritsche, A., Schivk, F., Häring, H., and Stumvoll, M. (2005). Elevated serum GGT concentrations predict reduced insulin sensitivity and increased intrahepatic lipids. *Hormone and Metabolic Research*, 37(04), 246-251.
155. Stranges, S., Dorn, J. M., Muti, P., Freudenheim, J. L., Farinaro, E., Russell, M., Nochajski, T. H., and Trevisan, M. (2004). Body fat distribution, relative weight, and liver enzyme levels: A population- based study. *Hepatology*, 39(3), 754-763.
156. Kwok, R., Tse, Y. K., Wong, G. H., Ha, Y., Lee, A. U., Ngu, M. C., Chan, H. L.-Y., and Wong, V. W.-S. (2014). Systematic review with meta- analysis: non- invasive assessment of non- alcoholic fatty liver disease—the role of transient elastography and plasma cytokeratin- 18 fragments. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 39(3), 254-269.
157. Feldstein, A. E., Wieckowska, A., Lopez, A. R., Liu, Y. C., Zein, N. N., and McCullough, A. J. (2009). Cytokeratin- 18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology*, 50(4), 1072-1078.

158. Chernbumroong, S., Grove, J. I., Astbury, S., Leeming, D. J., Kaye, P., Antoine, D. J., Hoad, C., Francis, S., Guha, I. N., Miller, M., Dillon, J. F., Allison, M., Aithal, G. P., and Garibaldi, J. (2017, October). Advanced machine learning techniques to identify a panel of biomarkers that identify nonalcoholic steatohepatitis. In *Hepatology*, 66, 53A-54A.
159. Targher, G., Bertolini, L., Scala, L., Poli, F., Zenari, L., and Falezza, G. (2004). Decreased plasma adiponectin concentrations are closely associated with nonalcoholic hepatic steatosis in obese individuals. *Clinical Endocrinology*, 61(6), 700-703.
160. Monsour Jr, H. P., Frenette, C. T., and Wyne, K. (2012). Fatty liver: a link to cardiovascular disease—its natural history, pathogenesis, and treatment. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, 8(3), 21-25.
161. Attar, B. M., and Van Thiel, D. H. (2013). Current concepts and management approaches in nonalcoholic fatty liver disease. *The Scientific World Journal*, 2013: 481893.
162. Fazel, Y., Koenig, A. B., Sayiner, M., Goodman, Z. D., and Younossi, Z. M. (2016). Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*, 65(8), 1017-1025.
163. Williams, A. L., and Hoofnagle, J. H. (1988). Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis relationship to cirrhosis. *Gastroenterology*, 95(3), 734-739.
164. Castéra, L., Vergniol, J., Foucher, J., Le Bail, B., Chanteloup, E., Haaser, M., Darriet, M., Couzigou, P., and De Lédinghen, V. (2005). Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 128(2), 343-350.
165. Vallet- Pichard, A., Mallet, V., Nalpas, B., Verkarre, V., Nalpas, A., Dhalluin-Venier, V., Fontaine, H., and Pol, S. (2007). FIB- 4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. comparison with liver biopsy and fibrotest. *Hepatology*, 46(1), 32-36.
166. Teshale, E., Lu, M., Rupp, L. B., Holmberg, S. D., Moorman, A. C., Spradling, P., Vijayadeva, V., Boscarino, J. A., Schmidt, M. A., Gordon S. C., and CheCS Investigators. (2014). APRI and FIB-4 are good predictors of the stage of liver fibrosis in chronic hepatitis B: the Chronic Hepatitis Cohort Study (CH e CS). *Journal of Viral Hepatitis*, 21(12), 917-920.
167. Wai, C. T., Greenson, J. K., Fontana, R. J., Kalbfleisch, J. D., Marrero, J. A., Conjeevaram, H. S., and Lok, A. S.-F. (2003). A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 38(2), 518-526.

168. Loeza-del-Castillo, A., Paz-Pineda, F., Oviedo-Cárdenas, E., Sánchez-Avila, F., and Vargas-Vorácková, F. (2008). AST to platelet ratio index (APRI) for the noninvasive evaluation of liver fibrosis. *Annals of Hepatology*, 7(4), 350-357.
169. Lichtinghagen, R., Pietsch, D., Bantel, H., Manns, M. P., Brand, K., and Bahr, M. J. (2013). The Enhanced Liver Fibrosis (ELF) score: normal values, influence factors and proposed cut-off values. *Journal of Hepatology*, 59(2), 236-242.
170. Angulo, P., Hui, J. M., Marchesini, G., Bugianesi, E., George, J., Farrell, G. C., Enders, F., Saksena, S., Burt, A. D., Bida, J. P., Lindor, K., Sanderson, S. O., Lenzi, M., Adams, L. A., Kench, J., Therneau, T. M., and Day, C. P. (2007). The NAFLD fibrosis score: a noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*, 45(4), 846-854.
171. Harrison, S. A., Oliver, D., Arnold, H. L., Gogia, S., and Neuschwander-Tetri, B. A. (2008). Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut*, 57(10), 1441-1447.
172. Okanoue, T., Ebise, H., Kai, T., Mizuno, M., Shima, T., Ichihara, J., and Aoki, M. (2018). A simple scoring system using type IV collagen 7S and aspartate aminotransferase for diagnosing nonalcoholic steatohepatitis and related fibrosis. *Journal of Gastroenterology*, 53(1), 129-139.
173. Forns, X., Ampurdanes, S., Llovet, J. M., Aponte, J., Quintó, L., Martínez-Bauer, E., Braguera, M., Sanchez-Tapias, J. M., and Rodés, J. (2002). Identification of chronic hepatitis C patients without hepatic fibrosis by a simple predictive model. *Hepatology*, 36(4), 986-992.
174. Imbert-Bismut, F., Ratziu, V., Pieroni, L., Charlotte, F., Benhamou, Y., and Poynard, T. (2001). Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *The Lancet*, 357(9262), 1069-1075.
175. Poynard, T., Imbert- Bismut, F., Ratziu, V., Chevret, S., Jardel, C., Moussalli, J., Messous, D., Degos, F., and GERMED cyt04 group. (2002). Biochemical markers of liver fibrosis in patients infected by hepatitis C virus: longitudinal validation in a randomized trial. *Journal of Viral Hepatitis*, 9(2), 128-133.
176. Myers, R. P., Ratziu, V., Imbert-Bismut, F., Charlotte, F., Poynard, T., and Multivirc Group. (2002). Biochemical markers of liver fibrosis: a comparison with historical features in patients with chronic hepatitis C. *The American Journal of Gastroenterology*, 97(9), 2419-2425.
177. Poynard, T., McHutchison, J., Manns, M., Myers, R. P., and Albrecht, J. (2003). Biochemical surrogate markers of liver fibrosis and activity in a randomized trial of peginterferon alfa-2b and ribavirin. *Hepatology*, 38(2), 481-492.
178. Thabut, D., Simon, M., Myers, R. P., Messous, D., Thibault, V., Imbert- Bismut, F., and Poynard, T. (2003). Noninvasive prediction of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 37(5), 1220-1221.

179. Calès, P., Oberti, F., Michalak, S., Hubert- Fouchard, I., Rousselet, M. C., Konaté, A., Gallois, Y., Ternisien, C., Chevailler, A., and Lunel, F. (2005). A novel panel of blood markers to assess the degree of liver fibrosis. *Hepatology*, 42(6), 1373-1381.
180. Adams, L. A., Bulsara, M., Rossi, E., DeBoer, B., Speers, D., George, J., Kench, J., Farrell, G., McCaughan, G. W., and Jeffrey, G. P. (2005). Hepascore: an accurate validated predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Clinical Chemistry*, 51(10), 1867-1873.
181. Vilar-Gomez, E., and Chalasani, N. (2018). Non-invasive assessment of non-alcoholic fatty liver disease: Clinical prediction rules and blood-based biomarkers. *Journal of Hepatology*, 68(2), 305-315.
182. Tannapfel, A., Denk, H., Dienes, H. P., Langner, C., Schirmacher, P., Trauner, M., and Flott-Rahmel, B. (2011). Histopathological diagnosis of non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *Virchows Archiv*, 458(5), 511-523.
183. Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A., and Bacon, B. R. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American Journal of Gastroenterology*, 94(9), 2467-2474.
184. Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., Ferrell, L. D., Liu, Y.-C., Torbenson, M. S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A. J., Sanyal, A. J., and Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41(6), 1313-1321.
185. Kleiner, D. E., and Brunt, E. M. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease: pathologic patterns and biopsy evaluation in clinical research. *Seminars in Liver Disease*, 32(1), 003-013.
186. Bedossa, P., Burt, A. D., Gouw, A. S., Lackner, C., Schirmacher, P., Terracciano, L., Tiniakos, D., Brain, J., Bury, Y., Cabibi, D., Charlotte, F., David, E., Losi, L., Montani, M., Pareja, M. J., Wendum, D., Wrba, F., Ziol, M., and Ratziu, V. (2014). Utility and appropriateness of the FLIP algorithm and SAF score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 60(2), 565-575.
187. Matteoni, C. A., Younossi, Z. M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y. C., McCullough, A. J. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*, 116(6), 1413-1419.
188. Mendler, M. H., Kanel, G., & Govindarajan, S. (2005). Proposal for a histological scoring and grading system for non- alcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 25(2), 294-304.
189. Vaughn, B. P., Rank, K. M., and Khoruts, A. (2019). Fecal microbiota transplantation: current status in treatment of GI and liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(2), 353-361.

190. Wolters, M., Ahrens, J., Romani-Pérez, M., Watkins, C., Sanz, Y., Benítez-Páez, A., Stanton, C., and Günther, K. (2019). Dietary fat, the gut microbiota, and metabolic health—A systematic review conducted within the MyNewGut project. *Clinical Nutrition*, 38(6), 2504-2520.
191. Cani, P. D. (2019). Microbiota and metabolites in metabolic diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(2), 69-70.
192. Depommier, C., Everard, A., Druart, C., Plovier, H., Van Hul, M., Vieira-Silva, S., Falony, G., Raes, J., Maiter, D., Delzenne, N. M., de Barse, M., Loumave, A., Michel, P., Thissen, J.-P., de Vos, W., and Cani, P. D. (2019). Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature Medicine*, 25(7), 1096-1103.
193. Beaumont, M., Neyrinck, A. M., Olivares, M., Rodriguez, J., de Rocca Serra, A., Roumain, M., Bindels, L. B., Cani, P.D., Evenepoel, P., Muccioli, G. G., Demoulin, J. B., and Delzenne, N. M. (2018). The gut microbiota metabolite indole alleviates liver inflammation in mice. *The FASEB Journal*, 32(12), 6681-6693.
194. Koh, A., Molinaro, A., Ståhlman, M., Khan, M. T., Schmidt, C., Mannerås-Holm, L., Wu, H., Carreras, A., Jeong, H., Olofsson, L. E., Bergh, P.-O., Gerdes, V., Hartstra, A., de Brauw, M., Perkins, R., Nieuwdorp, M., Bergström, G., and Bäckhed, F. (2018). Microbially produced imidazole propionate impairs insulin signaling through mTORC1. *Cell*, 175(4), 947-961.
195. Matsuzawa, Y., Nakahashi, H., Konishi, M., Sato, R., Kawashima, C., Kikuchi, S., Akiyama, E., Iwahashi, N., Maejima, N., Okada, K., Ebina, T., Hibi, K., Kosuge, M., Ishigami, T., Tamura, K., and Kimura, K. (2019). Microbiota-derived trimethylamine N-oxide predicts cardiovascular risk after STEMI. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11.
196. Yang, Q., Liang, Q., Balakrishnan, B., Belobrajdic, D. P., Feng, Q. J., and Zhang, W. (2020). Role of dietary nutrients in the modulation of gut microbiota: A narrative review. *Nutrients*, 12(2), 381.
197. Biolato, M., Manca, F., Marrone, G., Cefalo, C., Racco, S., Miggianno, G. A., Valenza, V., Gasbarrini, A., Miele, L., and Grieco, A. (2019). Intestinal permeability after Mediterranean diet and low-fat diet in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 25(4), 509-520.
198. Krawczyk, M., Maciejewska, D., Ryterska, K., Czerwińska-Rogowska, M., Jamiol-Milc, D., Skonieczna-Żydecka, K., Milkiewicz, P., Raszeja-Wyszomirska, J., and Stachowska, E. (2018). Gut permeability might be improved by dietary fiber in individuals with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) undergoing weight reduction. *Nutrients*, 10(11), 1793.
199. Kazankov, K., Jørgensen, S. M. D., Thomsen, K. L., Møller, H. J., Vilstrup, H., George, J., Schuppan, D., and Grønbaek, H. (2019). The role of macrophages in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(3), 145-159.

200. Zhou, Y., Zheng, T., Chen, H., Li, Y., Huang, H., Chen, W., Du, Y., He, J., Li, Y., Cao, J., Nie, Y., and Zhou, Y. (2018). Microbial intervention as a novel target in treatment of non-alcoholic fatty liver disease progression. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 51(5), 2123-2135.
201. Marshall, J. C. (1998). The gut as a potential trigger of exercise-induced inflammatory responses. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 76(5), 479-484.
202. Jiang, J. W., Chen, X. H., Ren, Z., and Zheng, S. S. (2019). Gut microbial dysbiosis associates hepatocellular carcinoma via the gut-liver axis. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 18(1), 19-27.
203. Ojeda, P., Bobe, A., Dolan, K., Leone, V., and Martinez, K. (2016). Nutritional modulation of gut microbiota—The impact on metabolic disease pathophysiology. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 28, 191-200.
204. Niehues, M., and Hensel, A. (2009). In- vitro interaction of l- dopa with bacterial adhesins of *Helicobacter pylori*: an explanation for clinical differences in bioavailability?. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(10), 1303-1307.
205. Brandl, K., Kumar, V., and Eckmann, L. (2017). Gut-liver axis at the frontier of host-microbial interactions. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312(5), G413-G419.
206. Beyaz Coşkun, A., and Sağdıçoğlu Celep, A. G. (2021). Therapeutic modulation methods of gut microbiota and gut-liver axis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-11.
207. Kobylak, N., Virchenko, O., and Falalyeyeva, T. (2015). Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity. *Nutrition Journal*, 15(43), 1-12.
208. Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., and Gordon, J. I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 979-984.
209. Cope, K., Risby, T., and Diehl, A. M. (2000). Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 119(5), 1340-1347.
210. Michail, S., Lin, M., Frey, M. R., Fanter, R., Paliy, O., Hilbush, B., and Reo, N. V. (2015). Altered gut microbial energy and metabolism in children with non-alcoholic fatty liver disease. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(2), 1-9.
211. Engstler, A. J., Aumiller, T., Degen, C., Dürr, M., Weiss, E., Maier, I. B., Schattenberg, J. M., Jin, C. J., and Bergheim, I. (2016). Insulin resistance alters hepatic ethanol metabolism: studies in mice and children with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*, 65(9), 1564-1571.

212. Da Zhou, J. And G. F. (2019). Microbial metabolites in non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 25(17): 2019-2028.
213. Ferslew, B. C., Xie, G., Johnston, C. K., Su, M., Stewart, P. W., Jia, W., Bruwer, K. L. R., and Barritt, A. S. (2015). Altered bile acid metabolome in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 60(11), 3318-3328.
214. Puri, P., Daita, K., Joyce, A., Mirshahi, F., Santhekadur, P. K., Cazanave, S., Luketic, V. A., Siddiqui, M. S., Boyett, S., Min, H.-K., Kumar, D. P., Kohli, R., Zhou, H., Hylemon, P. B., Contos, M. J., Idowu, M., and Sanyal, A. J. (2018). The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology*, 67(2), 534-548.
215. Canfora, E. E., Meex, R. C., Venema, K., and Blaak, E. E. (2019). Gut microbial metabolites in obesity, NAFLD and T2DM. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(5), 261-273.
216. Chambers, E. S., Viardot, A., Psichas, A., Morrison, D. J., Murphy, K. G., Zaccarelli, S. E., MacDougall, K., Preston, T., Tedford, C., Finlayson, G. S., Blundell, J. E., Bell, J. D., Thomas, E. L., Mt-Isa, S., Ashby, D., Gibson, G. R., Kolida, S., Dhillo, W. S., Bloom, S. R., Morley, W., Clegg, S., and Frost, G. (2015). Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut*, 64(11), 1744-1754.
217. Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., and Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18(1), 190-195.
218. Zhou, D., Pan, Q., Liu, X. L., Yang, R. X., Chen, Y. W., Liu, C., and Fan, J. G. (2017). Clostridium butyricum B1 alleviates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice via enterohepatic immunoregulation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32(9), 1640-1648.
219. Liang, Y., Lin, C., Zhang, Y., Deng, Y., Liu, C., and Yang, Q. (2018). Probiotic mixture of Lactobacillus and Bifidobacterium alleviates systemic adiposity and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease rats through Gpr109a and the commensal metabolite butyrate. *Inflammopharmacology*, 26(4), 1051-1055.
220. Schilderink, R., Verseijden, C., and de Jonge, W. J. (2013). Dietary inhibitors of histone deacetylases in intestinal immunity and homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 4, 226.
221. Zhou, D., Pan, Q., Xin, F.-Z., Zhang, R.-N., He, C.-X., Chen, G.-Y., Liu, C., Chen, Y.-W., and Fan, J.-G. (2017). Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. *World journal of gastroenterology*, 23(1), 60-75.

222. Zhou, D., Chen, Y.-W., Zhao, Z.-H., Yang, R.-X., Xin, F.-Z., Liu, X.-L., Pan, Q., Zhou, H., and Fan, J. G. (2018). Sodium butyrate reduces high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis through upregulation of hepatic GLP-1R expression. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(12), 1-12.
223. Bjursell, M., Admyre, T., Göransson, M., Marley, A. E., Smith, D. M., Oscarsson, J., and Bohlooly-Y, M. (2011). Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2-deficient mice fed a high-fat diet. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(1), E211-E220.
224. Diether, N. E., and Willing, B. P. (2019). Microbial fermentation of dietary protein: an important factor in diet–microbe–host interaction. *Microorganisms*, 7(1), 19.
225. Hoyles, L., Fernandez-Real, J. M., Federici, M., Serino, M., Abbott, J., Charpentier, J., Heymes, C., Luque, J. L., Anthony, E., Barton, R. H., Chilloux, J., Myridakis, A., Martinez-Gili, L., Moreno-Navarrete, J. M., Benhamed, F., Azalbert, V., Blasco-Baque, V., Puig, J., Xifra, G., Ricart, W., Tomlinson, C., Woodbridge, M., Cardellini, M., Davato, F., Cardolini, I., Porzio, O., Gentileschi, P., Lopez, F., Foufelle, F., Butcher, S. A., Holmez, E., Nicholson, J. K., Postic, C., Burcelin, R., and Dumas, M.-E. (2018). Molecular phenomics and metagenomics of hepatic steatosis in non-diabetic obese women. *Nature Medicine*, 24(7), 1070-1080.
226. Ottosson, F., Brunkwall, L., Ericson, U., Nilsson, P. M., Almgren, P., Fernandez, C., Melander, O., and Orho-Melander, M. (2018). Connection between BMI-related plasma metabolite profile and gut microbiota. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 103(4), 1491-1501.
227. Zhou, H., Yu, B., Gao, J., Htoo, J. K., and Chen, D. (2018). Regulation of intestinal health by branched- chain amino acids. *Animal Science Journal*, 89(1), 3-11.
228. Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J., and Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(18), 3313-3327.
229. Chakravarthy, M. V., Waddell, T., Banerjee, R., and Guess, N. (2020). Nutrition and nonalcoholic fatty liver disease: current perspectives. *Gastroenterology Clinics*, 49(1), 63-94.
230. Harrison, S. A., and Day, C. P. (2007). Benefits of lifestyle modification in NAFLD. *Gut*, 56(12), 1760-1769.
231. Hannah, W. N., and Harrison, S. A. (2016). Lifestyle and dietary interventions in the management of nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(5), 1365-1374.
232. Akyüz, F., Demir, K., Özdil, S., Aksoy, N., Poturoğlu, Ş., İbrişim, D., Kaymakoglu, S., Beşışık, F., Boztaş, G., Çakaloğlu, Y., Mungan, Z., Cevikbaş, U., and Okten, A. (2007). The effects of rosiglitazone, metformin, and diet with exercise in nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(9), 2359-2367.

233. Luyckx, F. H., Desai, C., Thiry, A., Dewe, W., Scheen, A. J., Gielen, J. E., and Lefebvre, P. J. (1998). Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastroplasty. *International Journal of Obesity*, 22(3), 222-226.
234. Weinsier, R. L., Wilson, L. J., and Lee, J. (1995). Medically safe rate of weight loss for the treatment of obesity: a guideline based on risk of gallstone formation. *The American Journal of Medicine*, 98(2), 115-117.
235. European Association for the Study of the Liver (EASL). European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO). (2016). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 64(6), 1388-1402.
236. Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J. E., Charlton, M., Cusi, K., Rinella, M., Harrison, S. A., Brunt, E. M., and Sanyal, A. J. (2018). The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, 67(1), 328-357.
237. Wong, V. W. S., Chan, W. K., Chitturi, S., Chawla, Y., Dan, Y. Y., Duseja, A., Fani J., Goh, K.-L., Hamaguchi, M., Hashimoto, E., Kim, S. U., Lesmana, L. A., Lin, Y.-C., Liu, C.-J., Ni, Y.-H., Sollano, J., Wong, S. K.-H., Wong, G. L.-H., Chan, H. L.-Y., and Farrell, G. (2018). Asia-Pacific Working Party on Non-alcoholic Fatty Liver Disease guidelines 2017—part 1: definition, risk factors and assessment. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 33(1), 70-85.
238. Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., Gordon, D. J., Krauss, R. M., Savage, P. J., Smith Jr, S. C., Spertus, J. A., and Costa, F. (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation*, 112(17), 2735-2752.
239. Sanyal, A. J. (2002). AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 123(5), 1705-1725.
240. Abdelmalek, M. F. (2010). Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 51, 1961-1971.
241. Soriguer, F., Morcillo, S., Cardona, F., Rojo-Martínez, G., de la Cruz Almaráz, M., de la Soledad Ruiz de Adana, M., Oliveira, G., Tinahones, F., and Esteva, I. (2006). Pro12Ala polymorphism of the PPARG2 gene is associated with type 2 diabetes mellitus and peripheral insulin sensitivity in a population with a high intake of oleic acid. *The Journal of Nutrition*, 136(9), 2325-2330.
242. Rezaei, S., Akhlaghi, M., Sasani, M. R., and Boldaji, R. B. (2019). Olive oil lessened fatty liver severity independent of cardiometabolic correction in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized clinical trial. *Nutrition*, 57, 154-161.

243. Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchette, J. L., Diehl, A. M., Johnson, R. J., and Abdelmalek, M. F. (2008). Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 48(6), 993-999.
244. Simopoulos, A. P. (2013). Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, 5(8), 2901-2923.
245. Ristic-Medic, D., Kovacic, M., Takic, M., Arsic, A., Petrovic, S., Paunovic, M., Jovicic, M., and Vucic, V. (2021). Calorie-Restricted Mediterranean and Low-Fat Diets Affect Fatty Acid Status in Individuals with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Nutrients*, 13(1), 15.
246. Al-Gayyar, M. M., Shams, M. E., and Barakat, E. A. (2012). Fish oil improves lipid metabolism and ameliorates inflammation in patients with metabolic syndrome: impact of nonalcoholic fatty liver disease. *Pharmaceutical Biology*, 50(3), 297-303.
247. Hoofnagle, J. H., Van Natta, M. L., Kleiner, D. E., Clark, J. M., Kowdley, K. V., Loomba, R., Neuschwander-Tetri, B. A., Sanyal, A. J., Tonascia, J., and Non-alcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network (NASH CRN). (2013). Vitamin E and changes in serum alanine aminotransferase levels in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 38(2), 134-143.
248. Abenavoli, L., Boccuto, L., Federico, A., Dallio, M., Loguercio, C., Di Renzo, L., and De Lorenzo, A. (2019). Diet and non-alcoholic fatty liver disease: the Mediterranean way. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(17), 3011.
249. Hekmatdoost, A., Shamsipour, A., Meibodi, M., Gheibizadeh, N., Eslamparast, T., and Poustchi, H. (2016). Adherence to the dietary approaches to stop hypertension (DASH) and risk of nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(8), 1024-1029.
250. Watzinger, C., Nonnenmacher, T., Grafetstätter, M., Sowah, S. A., Ulrich, C. M., Kauczor, H. U., Kaaks, R., Schübel, R., Nattenmüller, J., and Kühn, T. (2020). Dietary Factors in Relation to Liver Fat Content: A Cross-sectional Study. *Nutrients*, 12(3), 825.
251. The Italian Association for the Study of the Liver (AISF). (2017). AISF position paper on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): Updates and future directions. *Digestive and Liver Disease*, 49(5), 471-483.
252. Korean Association for the Study of the Liver (KASL). (2013). KASL clinical practice guidelines: management of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical and Molecular Hepatology*, 19(4), 325-348.
253. Del Ben, M., Polimeni, L., Baratta, F., Pastori, D., and Angelico, F. (2017). The role of nutraceuticals for the treatment of non- alcoholic fatty liver disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83(1), 88-95.

254. Gupta, V., Mah, X. J., Garcia, M. C., Antonypillai, C., and van der Poorten, D. (2015). Oily fish, coffee and walnuts: Dietary treatment for nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 21(37), 10621-10635.
255. Rodriguez-Ramiro, I., Vauzour, D., and Minihane, A. M. (2016). Polyphenols and non-alcoholic fatty liver disease: impact and mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*, 75(1), 47-60.
256. Wu, C. H., Lin, M. C., Wang, H. C., Yang, M. Y., Jou, M. J., and Wang, C. J. (2011). Rutin inhibits oleic acid induced lipid accumulation via reducing lipogenesis and oxidative stress in hepatocarcinoma cells. *Journal of Food Science*, 76(2), T65-T72.
257. Shimada, T., Tokuhara, D., Tsubata, M., Kamiya, T., Kamiya-Sameshima, M., Nagamine, R., Takagaki, K., Sai, Y., Miyamoto, K., and Aburada, M. (2012). Flavangenol (pine bark extract) and its major component procyanidin B1 enhance fatty acid oxidation in fat-loaded models. *European Journal of Pharmacology*, 677(1-3), 147-153.
258. Chang, H. C., Peng, C. H., Yeh, D. M., Kao, E. S., and Wang, C. J. (2014). Hibiscus sabdariffa extract inhibits obesity and fat accumulation, and improves liver steatosis in humans. *Food & Function*, 5(4), 734-739.
259. Abidov, M., Ramazanov, Z., Seifulla, R., and Grachev, S. (2010). The effects of Xanthigen™ in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 12(1), 72-81.
260. Molloy, J. W., Calcagno, C. J., Williams, C. D., Jones, F. J., Torres, D. M., and Harrison, S. A. (2012). Association of coffee and caffeine consumption with fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and degree of hepatic fibrosis. *Hepatology*, 55(2), 429-436.
261. Setiawan, V. W., Wilkens, L. R., Lu, S. C., Hernandez, B. Y., Le Marchand, L., and Henderson, B. E. (2015). Association of coffee intake with reduced incidence of liver cancer and death from chronic liver disease in the US multiethnic cohort. *Gastroenterology*, 148(1), 118-125.
262. Vitaglione, P., Morisco, F., Mazzone, G., Amoruso, D. C., Ribocco, M. T., Romano, A., Fogliano, V., Caporaso, N., and D'Argenio, G. (2010). Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: the underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. *Hepatology*, 52(5), 1652-1661.
263. Saab, S., Mallam, D., Cox, G. A., and Tong, M. J. (2014). Impact of coffee on liver diseases: a systematic review. *Liver International*, 34(4), 495-504.
264. Zeevi, D., Korem, T., Zmora, N., Israeli, D., Rothschild, D., Weinberger, A., Ben-Yacov, O., Lador, D., Avnit-Sagi, T., Lotan-Pompan, M., Suez, J., Mahdi, J. A., Matot, E., Malka, G., Kosower, N., Rein, M., Zilberman-Schapira, G., Dohnalova, L., Pevsner-Fischer, M., Bikovsky, R., Halpern, Z., Elinav, E., and Segal, E. (2015). Personalized nutrition by prediction of glycemic responses. *Cell*, 163(5), 1079-1094.

265. Romero-Gómez, M., Zelber-Sagi, S., and Trenell, M. (2017). Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *Journal of Hepatology*, 67(4), 829-846.
266. van der Windt, D. J., Sud, V., Zhang, H., Tsung, A., and Huang, H. (2018). The effects of physical exercise on fatty liver disease. *Gene Expression*, 18(2), 89-101.
267. Kwak, M. S., and Kim, D. (2018). Non-alcoholic fatty liver disease and lifestyle modifications, focusing on physical activity. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 33(1), 64-74.
268. Dalle Grave, R., Calugi, S., Centis, E., Marzocchi, R., El Ghoch, M., and Marchesini, G. (2010). Lifestyle modification in the management of the metabolic syndrome: achievements and challenges. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 3, 373-385.
269. Pérez-Martínez, P., Mikhailidis, D. P., Athyros, V. G., Bullo, M., Couture, P., Covas, M. I., de Koning, L., Delgado-Lista, J., Días-López, A., Drevon, C. A., Estruch, R., Esposito, K., Fito, M., Garaulet, M., Giugliano, D., Garcia-Rios, A., Katsiki, N., Kolovou, G., Lamarche, B., Maiorino, M. I., Mena-Sanchez, G., Munoz-Garach, A., Nikolic, D., Ordovas, J. M., Perez-Jimenez, F., Rizzo, M., Salas-Salvado, J., Schröder, H., Tinahones, F. J., de la Torre, R., van Ommen, B., Wopereis, S., Ros, E., and Lopez-Miranda, J. (2017). Lifestyle recommendations for the prevention and management of metabolic syndrome: an international panel recommendation. *Nutrition Reviews*, 75(5), 307-326.
270. Singh, S., Osna, N. A., and Kharbanda, K. K. (2017). Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: A review. *World Journal of Gastroenterology*, 23(36), 6549-6570.
271. Sabuncu, T., Nazligul, Y., Karaoglanoglu, M., Ucar, E., and Kilic, F. B. (2003). The effects of sibutramine and orlistat on the ultrasonographic findings, insulin resistance and liver enzyme levels in obese patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Romanian Journal of Gastroenterology*, 12(3), 189-192.
272. Zelber-Sagi, S., Kessler, A., Brazowsky, E., Webb, M., Lurie, Y., Santo, M., Leshno, M., Blendis, L., Halpern, Z., and Oren, R. (2006). A double-blind randomized placebo-controlled trial of orlistat for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(5), 639-644.
273. Sanyal, A. J., Friedman, S. L., McCullough, A. J., and Dimick- Santos, L. (2015). Challenges and opportunities in drug and biomarker development for nonalcoholic steatohepatitis: findings and recommendations from an American Association for the Study of Liver Diseases-US Food and Drug Administration Joint Workshop. *Hepatology*, 61(4), 1392-1405.
274. Hussain, S. S., and Bloom, S. R. (2011). The pharmacological treatment and management of obesity. *Postgraduate Medicine*, 123(1), 34-44.
275. Marcus, W. Y. (1992). Gastrointestinal surgery for severe obesity: a response. *Maryland Medical Journal (Baltimore, Md.: 1985)*, 41(3), 236-240.

276. Bian, H., Hakkarainen, A., Lundbom, N., and Yki-Järvinen, H. (2014). Effects of dietary interventions on liver volume in humans. *Obesity*, 22(4), 989-995.
277. Hsu, C. C., Ness, E., and Kowdley, K. V. (2017). Nutritional approaches to achieve weight loss in nonalcoholic fatty liver disease. *Advances in Nutrition*, 8(2), 253-265.
278. Grimm, I. S., Schindler, W., and Haluszka, O. (1992). Steatohepatitis and fatal hepatic failure after biliopancreatic diversion. *American Journal of Gastroenterology (Springer Nature)*, 87(6): 775-779.
279. Stephen, S., Baranova, A., and Younossi, Z. M. (2012). Nonalcoholic fatty liver disease and bariatric surgery. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 6(2), 163-171.
280. Sanders, M. E., Merenstein, D., Merrifield, C. A., and Hutkins, R. (2018). Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*, 43(3), 212-225.
281. Zawistowska-Rojek, A., and Tyski, S. (2018). Are probiotic really safe for humans?. *Polish Journal of Microbiology*, 67(3), 251-528.
282. Snyderman, D. R. (2008). The safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 46(Supplement_2), S104-S111.
283. Houghton, D., Stewart, C. J., Day, C. P., and Trenell, M. (2016). Gut microbiota and lifestyle interventions in NAFLD. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 447.
284. Sáez-Lara, M. J., Robles-Sanchez, C., Ruiz-Ojeda, F. J., Plaza-Diaz, J., and Gil, A. (2016). Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: a review of human clinical trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 928.
285. Mokhtari, Z., Gibson, D. L., and Hekmatdoost, A. (2017). Nonalcoholic fatty liver disease, the gut microbiome, and diet. *Advances in Nutrition*, 8(2), 240-252.
286. Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., and Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502.
287. Chugh, B., and Kamal-Eldin, A. (2020). Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 76-82.
288. Galdeano, C. M., Cazorla, S. I., Dumit, J. M. L., Vélez, E., and Perdigón, G. (2019). Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(2), 115-124.
289. Wang, Y., Wu, Y., Wang, Y., Xu, H., Mei, X., Yu, D., Wang, Y., and Li, W. (2017). Antioxidant properties of probiotic bacteria. *Nutrients*, 9(5), 521.

290. Vajro, P., Mandato, C., Licenziati, M. R., Franzese, A., Vitale, D. F., Lenta, S., Caropreso, M., Vallone, G., and Meli, R. (2011). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pediatric obesity-related liver disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 52(6), 740-743.
291. Famouri, F., Shariat, Z., Hashemipour, M., Keikha, M., and Kelishadi, R. (2017). Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease in obese children and adolescents. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 64(3), 413-417.
292. Kobyliak, N., Abenavoli, L., Mykhalchyshyn, G., Kononenko, L., Boccuto, L., Kyriienko, D., and Dynnyk, O. (2018). A multi-strain probiotic reduces the fatty liver index, cytokines and aminotransferase levels in NAFLD patients: evidence from a randomized clinical trial. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 27(1), 41-49.
293. Kobyliak, N., Abenavoli, L., Falalyeyeva, T., Mykhalchyshyn, G., Boccuto, L., Kyriienko, D., Komisarenko, I., and Dynnyk, O. (2018b). Beneficial effects of probiotic combination with omega-3 fatty acids in NAFLD: a randomized clinical study. *Minerva Medica*, 109(6), 418-428.
294. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *FAO/WHO Working Group*, London, Ontario, Canada.
295. Hempel, S., Newberry, S., Ruelaz, A., Wang, Z., Miles, J. N., Suttorp, M. J., Johnsen, B., Shanman, R., Slusser, W., Fu, N., Smith, A., Roth, B., Polak, J., Motala, A., Perry, T., and Shekelle, P. G. (2011). Safety of probiotics used to reduce risk and prevent or treat disease. *Evidence Report/Technology Assessment*, 200, 1-645.
296. Kothari, D., Patel, S., and Kim, S. K. (2019). Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 537-547.
297. Doron, S., and Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S129-S134.
298. Tsai, Y. L., Lin, T. L., Chang, C. J., Wu, T. R., Lai, W. F., Lu, C. C., and Lai, H. C. (2019). Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases. *Journal of Biomedical Science*, 26(3), 1-8.
299. Carlson, J. L., Erickson, J. M., Lloyd, B. B., and Slavin, J. L. (2018). Health effects and sources of prebiotic dietary fiber. *Current Developments in Nutrition*, 2(3), nzy005.
300. Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., and Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, 8(3), 92.
301. Holscher, H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, 8(2), 172-184.

302. Bomhof, M. R., Parnell, J. A., Ramay, H. R., Crotty, P., Rioux, K. P., Probert, C. S., Jayakumar, S., Raman, M., and Reimer, R. A. (2019). Histological improvement of non-alcoholic steatohepatitis with a prebiotic: a pilot clinical trial. *European Journal of Nutrition*, 58(4), 1735-1745.
303. Hadi, A., Ghaedi, E., Khalesi, S., Pourmasoumi, M., and Arab, A. (2020). Effects of synbiotic consumption on lipid profile: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *European Journal of Nutrition*, 59(7): 2857-2874.
304. Sangouni, A. A., and Ghavamzadeh, S. (2019). A review of synbiotic efficacy in non-alcoholic fatty liver disease as a therapeutic approach. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(5), 2917-2922.
305. Swanson, K. S., Gibson, G. R., Hutkins, R., Reimer, R. A., Reid, G., Verbeke, K., Scott, K. P., Holscher, H. D., Azad, M. B., Delzenne, N. M., and Sanders, M. E. (2020). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(11), 687-701.
306. Bustamante, M., Oomah, B. D., Oliveira, W. P., Burgos-Díaz, C., Rubilar, M., and Shene, C. (2020). Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. *Folia Microbiologica*, 65(2), 245-264.
307. Loman, B. R., Hernández-Saavedra, D., An, R., and Rector, R. S. (2018). Prebiotic and probiotic treatment of nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 76(11), 822-839.
308. Pandey, K. R., Naik, S. R., and Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577-7587.
309. Ferolla, S. M., Couto, C. A., Costa-Silva, L., Armiliato, G. N. A., Pereira, C. A. S., Martins, F. S., de Lourdes A. Ferrari, M., Vilela, E. G., Torres H. O. G., Cunha, A. S., and Ferrari, T. C. A. (2016). Beneficial effect of synbiotic supplementation on hepatic steatosis and anthropometric parameters, but not on gut permeability in a population with nonalcoholic steatohepatitis. *Nutrients*, 8(7), 397.
310. Ekhlasi, G., Zarrati, M., Agah, S., Hosseini, A. F., Hosseini, S., Shidfar, S., Aarbshahi, S. S. S., Razmpoosh, E., and Shidfar, F. (2017). Effects of symbiotic and vitamin E supplementation on blood pressure, nitric oxide and inflammatory factors in non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 16, 278-290.
311. Bakhshimoghaddam, F., Shateri, K., Sina, M., Hashemian, M., and Alizadeh, M. (2018). Daily consumption of synbiotic yogurt decreases liver steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a randomized controlled clinical trial. *The Journal of Nutrition*, 148(8), 1276-1284.
312. Becattini, S., Taur, Y., and Pamer, E. G. (2016). Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 22(6), 458-478.

313. Wiest, R., Bajaj, A., Albillos, M., Trauner, M., and Jalan, R. (2017). Targeting the gut-liver axis in liver disease. *Journal of Hepatology*, 67(5), 1084-1103.
314. Ponziani, F. R., Gerardi, V., Pecere, S., D'Aversa, F., Lopetuso, L., and Zocco, M. A. (2015). Effect of rifaximin on gut microbiota composition in advanced liver disease and its complications. *World Journal of Gastroenterology*, 21(43), 12322-12333.
315. Abdel-Razik, A., Mousa, N., Shabana, W., Refaey, M., Elzehery, R., Elhelaly, R., Zalata, K., Abdelsalam, M., Eldeeb, A. A., Awad, M., Elgamal, A., Attia, A., El-Wakeel, N., and Eldars, W. (2018). Rifaximin in nonalcoholic fatty liver disease: hit multiple targets with a single shot. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 30(10), 1237-1246.
316. Pose, E., Napoleone, L., Amin, A., Campion, D., Jimenez, C., Piano, S., Roux, O., Uschner, F. E., de Wit, K., Zaccherini, G., Alessandria, C., Angelini, P., Bernardi, M., Beuers, U., Caraceni, P., Durand, F., Mookerjee, R. P., Trebicka, J., Vargas, V., Andrade, R. J., Carol, M., Pich, J., Ferrero, J., Domenech, G., Llopis, M., Torres, F., Kamath, P. S., Abdalres, J. G., Sola, E., and Gines, P. (2020). Safety of two different doses of simvastatin plus rifaximin in decompensated cirrhosis (LIVERHOPE-SAFETY): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 5(1), 31-41.
317. Álvarez, R., Cortés, L. E. L., Molina, J., Cisneros, J. M., and Pachón, J. (2016). Optimizing the clinical use of vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), 2601-2609.
318. Türkan, F., and Atalar, M. N. (2018). The effects of amoxicillin and vancomycin hydrochloride hydrate on glutathione S-transferase enzyme activity: an in vitro study. *Iğdır University Journal of the Institute of Science and Technology*, 8(2), 141-148.
319. Ponziani, F. R., Scaldaferri, F., Petito, V., Sterbini, F. P., Pecere, S., Lopetuso, L. R., Palladini, A., Gerardi, V., Masucci, L., Pompili, M., Cammarota, G., Sanguinetti, M., and Gasbarrini, A. (2016). The role of antibiotics in gut microbiota modulation: the eubiotic effects of rifaximin. *Digestive Diseases*, 34(3), 269-278.
320. Wahlström, A., Sayin, S. I., Marschall, H. U., and Bäckhed, F. (2016). Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metabolism*, 24(1), 41-50.
321. Arab, J. P., Arrese, M., and Trauner, M. (2018). Recent insights into the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13, 321-350.
322. Wang, Y. D., Chen, W. D., Yu, D., Forman, B. M., and Huang, W. (2011). The G-Protein- coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) in mice. *Hepatology*, 54(4), 1421-1432.

323. Fiorucci, S. and Distrutti, E. (Editors). (2019). *Nonsteroidal FXR ligands: current status and clinical applications. Bile Acids and Their Receptors (Handbook of Experimental Pharmacology)*, 1 st ed. Springer, 167-205.
324. Haczeyni, F., Poekes, L., Wang, H., Mridha, A. R., Barn, V., Geoffrey Haigh, W., Ioannou, G. N., Yeh, M. M., Leclercq, I. A., Teoh, N. N., and Farrell, G. C. (2017). Obeticholic acid improves adipose morphometry and inflammation and reduces steatosis in dietary but not metabolic obesity in mice. *Obesity*, 25(1), 155-165.
325. Hu, Y. B., Liu, X. Y., and Zhan, W. (2018). Farnesoid X receptor agonist INT-767 attenuates liver steatosis and inflammation in rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 2213-2221.
326. De Oliveira, M. C., Gilgioni, E. H., De Boer, B. A., Runge, J. H., De Waart, D. R., Salgueiro, C. L., Ishii-Iwamoto, E. L., Oude Elferink, R. P. J., and Gaemers, I. C. (2016). Bile acid receptor agonists INT747 and INT777 decrease oestrogen deficiency-related postmenopausal obesity and hepatic steatosis in mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1862(11), 2054-2062.
327. Le Guern, R., Stabler, S., Gosset, P., Pichavant, M., Grandjean, T., Faure, E., Karaca, Y., Faure, K., Kipnis, E., and Dessein, R. (2021). Colonisation resistance against multidrug-resistant bacteria: a narrative review. *Journal of Hospital Infection*, 118, 48-58.
328. Tsuchida, Y., Wilhelms, A., Major, A., Davies, S., Linton, M., and Kon, V. (2016). Oral Activated Charcoal Adsorbent (AST-120) Inhibition of Chronic Kidney Disease-induced Atherosclerosis Involves Modulation of Intestinal Immunity. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(suppl_1): Abstract264.
329. Pan, X., Wen, S. W., Kaminga, A. C., and Liu, A. (2020). Gut metabolites and inflammation factors in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, 10(1): 8848, 1-11.
330. Macnaughtan, J., Ranchal, I., Soeda, J., Sawhney, R., Oben, J., Davies, N., Mookerjee, R., Marchesi, J., Cox, J., and Jalan, R. (2015). PTH-095 Oral carbon therapy is associated with a selective modulation of the microbiome in cirrhotic rats which is associated with a significant reduction in inflammatory activation. *Gut*, 64(Suppl 1):A1-A584.
331. Ferrere, G., Wrzosek, L., Cailleux, F., Turpin, W., Puchois, V., Spatz, M., Ciocan, D., Rainteau, D., Humbert, L., Hugot, C., Gaudin, F., Noordine, M-L., Robert, V., Berrebi, D., Thomas, M., Naveau, S., Perlemuter, G., and Cassard, A.-M. (2017). Fecal microbiota manipulation prevents dysbiosis and alcohol-induced liver injury in mice. *Journal of Hepatology*, 66(4), 806-815.
332. Wang, J. W., Kuo, C. H., Kuo, F. C., Wang, Y. K., Hsu, W. H., Yu, F. J., Hu, H.-M., Hsu, P.-I., Wang, J.-Y., and Wu, D. C. (2019). Fecal microbiota transplantation: review and update. *Journal of the Formosan Medical Association*, 118, S23-S31.

333. Cammarota, G., Ianiro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., Sokol, H., Arkkila, P., Pintus, C., Hart, A., Segal, J., Aloï, M., Masucci, L., Molinaro, A., Scaldaferri, F., Gasbarrini, G., Lopez-Sanroman, A., Link, A., de Groot, P., de Vos, W. M., Högenauer, C., Malfertheiner, P., Mattila, E., Milosavljevic, T., Nieuwdorp, M., Sanguinetti, M., Simren, M., and Gasbarrini, A. (2017). European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*, 66(4), 569-580.
334. Hurley, J. M., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2016). The circadian system as an organizer of metabolism. *Fungal Genetics and Biology*, 90, 39-43.
335. Hastings, M. H., Reddy, A. B., and Maywood, E. S. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(8), 649-661.
336. Mohawk, J. A., Green, C. B., and Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual Review of Neuroscience*, 35, 445-462.
337. Farhud, D., and Aryan, Z. (2018). Circadian rhythm, lifestyle and health: a narrative review. *Iranian Journal of Public Health*, 47(8), 1068-1076.
338. Roenneberg, T., and Merrow, M. (2016). The circadian clock and human health. *Current Biology*, 26(10), R432-R443.
339. Voigt, R. M., Forsyth, C. B., Green, S. J., Engen, P. A., and Keshavarzian, A. (2016). Circadian rhythm and the gut microbiome. *International Review of Neurobiology*, 131, 193-205.
340. Curtis, A. M., Bellet, M. M., Sassone-Corsi, P., and O'Neill, L. A. (2014). Circadian clock proteins and immunity. *Immunity*, 40(2), 178-186.
341. Schibler, U. (2005). The daily rhythms of genes, cells and organs: biological clocks and circadian timing in cells. *EMBO Reports*, 6(S1), S9-S13.
342. Thaïss, C. A., Zeevi, D., Levy, M., Zilberman-Schapira, G., Suez, J., Tengeler, A. C., Abramson, L., Katz, M. N., Korem, T., Zmora, N., Kuperman, Y., Biton, I., Gliad, S., Harmelin, A., Shapiro, H., Halpem, Z., Segal, E., and Elinav, E. (2014). Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*, 159(3), 514-529.
343. Van Der Horst, G. T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S. I., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A. P. M., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. J. and Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398(6728), 627-630.
344. Bass, J., and Takahashi, J. S. (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*, 330(6009), 1349-1354.

345. Grimaldi, B., Nakahata, Y., Kaluzova, M., Masubuchi, S., and Sassone-Corsi, P. (2009). Chromatin remodeling, metabolism and circadian clocks: the interplay of CLOCK and SIRT1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(1), 81-86.
346. Kraft, M., Djukanovic, R., Wilson, S., Holgate, S. T., and Martin, R. J. (1996). Alveolar tissue inflammation in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 154(5), 1505-1510.
347. Paschos, G. K., and FitzGerald, G. A. (2010). Circadian clocks and vascular function. *Circulation Research*, 106(5), 833-841.
348. Haus, E., Sackett-Lundeen, L., and Smolensky, M. H. (2012). Circadian Rhythms in Disease Activity, Signs and Symptoms, and Rationale for Chronotherapy with Corticosteroids and Other Medications. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 70(1), S3-S10.
349. Sahar, S., and Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nature Reviews Cancer*, 9(12), 886-896.
350. Cutolo, M., and Straub, R. H. (2008). Circadian rhythms in arthritis: hormonal effects on the immune/inflammatory reaction. *Autoimmunity Reviews*, 7(3), 223-228.
351. Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepka, S. M., Hong, H.-K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., and Takahashi, J. S. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(15), 5339-5346.
352. Xu, T., and Lu, B. (2019). The effects of phytochemicals on circadian rhythm and related diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(6), 882-892.
353. Wells, J. M., Rossi, O., Meijerink, M., and van Baarlen, P. (2011). Epithelial crosstalk at the microbiota–mucosal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4607-4614.
354. West, A. C., and Bechtold, D. A. (2015). The cost of circadian desynchrony: Evidence, insights and open questions. *Bioessays*, 37(7), 777-788.
355. Guo, H., Brewer, J. M., Lehman, M. N., and Bittman, E. L. (2006). Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *Journal of Neuroscience*, 26(24), 6406-6412.
356. Roenneberg, T., Kantermann, T., Juda, M., Vetter, C., and Allebrandt, K. V. (2013). Light and the human circadian clock. *Circadian Clocks*, 311-331.
357. Zisapel, N. (2018). New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *British Journal of Pharmacology*, 175(16), 3190-3199.

358. Burke, T. M., Markwald, R. R., McHill, A. W., Chinoy, E. D., Snider, J. A., Bessman, S. C., Jung, C. M., O'Neill, J. S., and Wright, K. P. (2015). Effects of caffeine on the human circadian clock in vivo and in vitro. *Science Translational Medicine*, 7(305), 305ra146.
359. Wittmann, M., Dinich, J., Merrow, M., and Roenneberg, T. (2006). Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiology International*, 23(1-2), 497-509.
360. Oosterman, J. E., Kalsbeek, A., la Fleur, S. E., and Belsham, D. D. (2015). Impact of nutrients on circadian rhythmicity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(5), R337-R350.
361. Goel, N., Basner, M., and Dinges, D. F. (2015). Phenotyping of neurobehavioral vulnerability to circadian phase during sleep loss. *Methods in Enzymology*, 552, 285-308.
362. Klerman, E. B., and Dijk, D. J. (2005). Interindividual variation in sleep duration and its association with sleep debt in young adults. *Sleep*, 28(10), 1253-1259.
363. Möller-Levet, C. S., Archer, S. N., Bucca, G., Laing, E. E., Slak, A., Kabiljo, R., Lo, J. C. Y., Santhi, N., von Schantz, M., Smith, C. P., and Dijk, D.-J. (2013). Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(12), E1132-E1141.
364. Archer, S. N., Laing, E. E., Möller-Levet, C. S., van der Veen, D. R., Bucca, G., Lazar, A. S., Santhi, N., Slak, A., Kabiljo, R., von Schantz, M., Smith, C. P., and Dijk, D.-J. (2014). Mistimed sleep disrupts circadian regulation of the human transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(6), E682-E691.
365. Nowrousian, M. (Editors) (2014). *Photobiology and circadian clocks in Neurospora. In Fungal Genomics*, Springer, Berlin, Heidelberg, 121-148.
366. Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., and Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7728-7733.
367. Gooley, J. J. (2008). Treatment of circadian rhythm sleep disorders with light. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 37(8), 669-676.
368. Burgess, H. J., and Molina, T. A. (2014). Home lighting before usual bedtime impacts circadian timing: a field study. *Photochemistry and Photobiology*, 90(3), 723-726.
369. Fonken, L. K., Weil, Z. M., and Nelson, R. J. (2013). Mice exposed to dim light at night exaggerate inflammatory responses to lipopolysaccharide. *Brain, Behavior, and Immunity*, 34, 159-163.

370. Fujioka, A., Fujioka, T., Tsuruta, R., Izumi, T., Kasaoka, S., and Maekawa, T. (2011). Effects of a constant light environment on hippocampal neurogenesis and memory in mice. *Neuroscience Letters*, 488(1), 41-44.
371. Dauchy, R. T., Dauchy, E. M., Tirrell, R. P., Hill, C. R., Davidson, L. K., Greene, M. W., Tirrell, P. C., Wu, J., Sauer, L. A., and Blask, D. E. (2010). Dark-phase light contamination disrupts circadian rhythms in plasma measures of endocrine physiology and metabolism in rats. *Comparative Medicine*, 60(5), 348-356.
372. Fonken, L. K., Finy, M. S., Walton, J. C., Weil, Z. M., Workman, J. L., Ross, J., and Nelson, R. J. (2009). Influence of light at night on murine anxiety-and depressive-like responses. *Behavioural Brain Research*, 205(2), 349-354.
373. Xie, Z., Chen, F., Li, W. A., Geng, X., Li, C., Meng, X., Feng, Y., Liu, W., and Yu, F. (2017). A review of sleep disorders and melatonin. *Neurological Research*, 39(6), 559-565.
374. Isojima, Y., Nakajima, M., Ukai, H., Fujishima, H., Yamada, R. G., Masumoto, K. H., Kiuchi, R., Ishida, M., Ukai-Tadenuma, M., Minami, Y., Kito, R., Nakao, K., Kishimoto, W., Yoo, S.-H., Shimomura, K., Takao, T., Takano, A., Kojima, T., Nagai, K., Sakaki, Y., Takahashi, J. S., and Ueda, H. R. (2009). CKI ϵ / δ -dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15744-15749.
375. Narasimamurthy, R., and Virshup, D. M. (2017). Molecular mechanisms regulating temperature compensation of the circadian clock. *Frontiers in Neurology*, 8, 161.
376. Buhr, E. D., Yoo, S. H., and Takahashi, J. S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330(6002), 379-385.
377. Ohnishi, N., Tahara, Y., Kuriki, D., Haraguchi, A., and Shibata, S. (2014). Warm water bath stimulates phase-shifts of the peripheral circadian clocks in PER2: LUCIFERASE mouse. *PLoS One*, 9(6), e100272.
378. Dudek, M., Yang, N., Ruckshanthi, J. P., Williams, J., Borysiewicz, E., Wang, P., Adamson, A., Li, J., Bateman, J. F., White, M. R., Boot-Handford, R. P., Hoyland, J. A., and Meng, Q.-J. (2017). The intervertebral disc contains intrinsic circadian clocks that are regulated by age and cytokines and linked to degeneration. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(3), 576-584.
379. Spörl, F., Schellenberg, K., Blatt, T., Wenck, H., Wittern, K. P., Schrader, and A., Kramer, A. (2011). A circadian clock in HaCaT keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(2), 338-348.
380. Hurley, J., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2015). Dissecting the mechanisms of the clock in *Neurospora*. *Methods in Enzymology*, 551, 29-52.
381. Roenneberg, T., Allebrandt, K. V., Mewes, M., and Vetter, C. (2012). Social jetlag and obesity. *Current Biology*, 22(10), 939-943.

382. Ruan, W., Yuan, X., and Eltzschig, H. K. (2021). Circadian rhythm as a therapeutic target. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(4), 287-307.
383. Auger, R. R. (Editors). (2020). *Jet lag sleep disorder*. In *Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders*, Springer, Cham, 199-205.
384. Saksvik, I. B., Bjorvatn, B., Hetland, H., Sandal, G. M., and Pallesen, S. (2011). Individual differences in tolerance to shift work—a systematic review. *Sleep Medicine Reviews*, 15(4), 221-235.
385. Kogi, K. (2005). International research needs for improving sleep and health of workers. *Industrial Health*, 43(1), 71-79.
386. Dijk, D. J., and Czeisler, C. A. (1994). Paradoxical timing of the circadian rhythm of sleep propensity serves to consolidate sleep and wakefulness in humans. *Neuroscience Letters*, 166(1), 63-68.
387. James, S. M., Honn, K. A., Gaddameedhi, S., and Van Dongen, H. P. (2017). Shift work: disrupted circadian rhythms and sleep—implications for health and well-being. *Current Sleep Medicine Reports*, 3(2), 104-112.
388. Van Dongen, H. P., and Dinges, D. F. (2005). Sleep, circadian rhythms, and psychomotor vigilance. *Clinics in Sports Medicine*, 24(2), 237-49.
389. Kryger, M, Roth, T, and Dement, W. C. (Editors). (2017). *Performance deficits during sleep loss and their operational consequences*. In *Principles and Practice of Sleep Medicine*, Elsevier, 682-688.
390. Rao, S. S., Sadeghi, P., Beaty, J., Kavlock, R., and Ackerson, K. (2001). Ambulatory 24-h colonic manometry in healthy humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(4), G629-G639.
391. Han, S., Zhang, R., Jain, R., Shi, H., Zhang, L., Zhou, G., Sangwung, P., Tugal, D., Atkins, G. B., Prosdocimo, D. A., Lu, Y., Han, X., Tso, P., Liao, X., Epstein, J. A., and Jain, M. K. (2015). Circadian control of bile acid synthesis by a KLF15-Fgf15 axis. *Nature Communications*, 6(1), 1-9.
392. Hussain, M. M., and Pan, X. (2015). Circadian regulation of macronutrient absorption. *Journal of Biological Rhythms*, 30(6), 459-469.
393. Morgan, L., Arendt, J., Owens, D., Folkard, S., Hampton, S., Deacon, S., English, J., Ribeiro, D., and Taylor, K. (1998). Effects of the endogenous clock and sleep time on melatonin, insulin, glucose and lipid metabolism. *Journal of Endocrinology*, 157(3), 443-452.
394. Scheer, F. A., Hilton, M. F., Mantzoros, C. S., and Shea, S. A. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11), 4453-4458.

395. Scheer, F. A., Morris, C. J., and Shea, S. A. (2013). The internal circadian clock increases hunger and appetite in the evening independent of food intake and other behaviors. *Obesity*, 21(3), 421-423.
396. Morris, C. J., Garcia, J. I., Myers, S., Yang, J. N., Trienekens, N., and Scheer, F. A. (2015). The human circadian system has a dominating role in causing the morning/evening difference in diet-induced thermogenesis. *Obesity*, 23(10), 2053-2058.
397. Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., and Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development*, 14(23), 2950-2961.
398. Garaulet, M., and Gómez-Abellán, P. (2014). Timing of food intake and obesity: a novel association. *Physiology & Behavior*, 134, 44-50.
399. Asher, G., and Sassone-Corsi, P. (2015). Time for food: the intimate interplay between nutrition, metabolism, and the circadian clock. *Cell*, 161(1), 84-92.
400. Kuroda, H., Tahara, Y., Saito, K., Ohnishi, N., Kubo, Y., Seo, Y., Otsuka, M., Fuse, Y., Ohura, Y., Hirao, A., and Shibata, S. (2012). Meal frequency patterns determine the phase of mouse peripheral circadian clocks. *Scientific Reports*, 2(1), 1-6.
401. Mattson, M. P., Allison, D. B., Fontana, L., Harvie, M., Longo, V. D., Malaisse, W. J., Mosley, M., Notterpek, L., Ravussin, E., Scheer, F. A. J. L., Seyfried, T. N., Varady, K. A. and Panda, S. (2014). Meal frequency and timing in health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16647-16653.
402. Leone, V., Gibbons, S. M., Martinez, K., Hutchison, A. L., Huang, E. Y., Cham, C. M., Pierre, J. F., Heneghan, A. F., Nadimpalli, A., Hubert, N., Zale, E., Wang, Y., Huang, Y., Theriault, B., Dinner, A. R., Musch, M. W., Kudsk, K. A., Prendergast, B. J., Gilbert, J. A., and Chang, E. B. (2015). Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 681-689.
403. Kohsaka, A., Laposky, A. D., Ramsey, K. M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., Turek, F. W., and Bass, J. (2007). High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metabolism*, 6(5), 414-421.
404. Eckel-Mahan, K., and Sassone-Corsi, P. (2013). Metabolism and the circadian clock converge. *Physiological Reviews*, 93(1), 107-135.
405. Fontaine, C., Dubois, G., Duguay, Y., Helledie, T., Vu-Dac, N., Gervois, P., Soncin, F., Mandrup, S., Fruchart, J. – C., Fruchart-Najib, J., and Staels, B. (2003). The orphan nuclear receptor Rev-Erba is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ target gene and promotes PPAR γ -induced adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37672-37680.
406. Forsyth, C. B., Voigt, R. M., Burgess, H. J., Swanson, G. R., and Keshavarzian, A. (2015). Circadian rhythms, alcohol and gut interactions. *Alcohol*, 49(4), 389-398.

407. Huang, M. C., Ho, C. W., Chen, C. H., Liu, S. C., Chen, C. C., and Leu, S. J. (2010). Reduced expression of circadian clock genes in male alcoholic patients. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(11), 1899-1904.
408. Sherman, H., Gutman, R., Chapnik, N., Meylan, J., Le Coutre, J., and Froy, O. (2011). Caffeine alters circadian rhythms and expression of disease and metabolic markers. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(5), 829-838.
409. Piérard, C., Beaumont, M., Enslen, M., Chauffard, F., Tan, D. X., Reiter, R. J., Fontan, A., French, J., Coste, O., and Lagarde, D. (2001). Resynchronization of hormonal rhythms after an eastbound flight in humans: effects of slow-release caffeine and melatonin. *European Journal of Applied Physiology*, 85(1), 144-150.
410. Ribas-Latre, A., Baselga-Escudero, L., Casanova, E., Arola-Arnal, A., Salvadó, M. J., Bladé, C., and Arola, L. (2015). Dietary proanthocyanidins modulate BMAL1 acetylation, Namp1 expression and NAD levels in rat liver. *Scientific Reports*, 5(1), 1-13.
411. Pifferi, F., Dal-Pan, A., Menaker, M., and Aujard, F. (2011). Resveratrol dietary supplementation shortens the free-running circadian period and decreases body temperature in a prosimian primate. *Journal of Biological Rhythms*, 26(3), 271-275.
412. Zwighaft, Z., Aviram, R., Shalev, M., Rouso-Noori, L., Kraut-Cohen, J., Golik, M., Brandis, A., Reinke, H., Aharoni, A., Kahana, C., and Asher, G. (2015). Circadian clock control by polyamine levels through a mechanism that declines with age. *Cell Metabolism*, 22(5), 874-885.
413. Mi, Y., Qi, G., Gao, Y., Li, R., Wang, Y., Li, X., Huang, S., and Liu, X. (2017). (-)-Epigallocatechin-3-gallate Ameliorates Insulin Resistance and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells: Involvement of Bmal1. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(12), 1700440.
414. Li, H., Kek, H. C., Lim, J., Gelling, R. W., and Han, W. (2016). Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate counteracts daytime overeating induced by high-fat diet in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(12), 2565-2575.
415. Sun, L., Wang, Y., Song, Y., Cheng, X. R., Xia, S., Rahman, M. R. T., Shi, Y., and Le, G. (2015). Resveratrol restores the circadian rhythmic disorder of lipid metabolism induced by high-fat diet in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(1), 86-91.
416. Miranda, J., Portillo, M. P., Madrid, J. A., Arias, N., Macarulla, M. T., and Garaulet, M. (2013). Effects of resveratrol on changes induced by high-fat feeding on clock genes in rats. *British Journal of Nutrition*, 110(8), 1421-1428.
417. Park, I., Lee, Y., Kim, H. D., and Kim, K. (2014). Effect of resveratrol, a SIRT1 activator, on the interactions of the CLOCK/BMAL1 complex. *Endocrinology and Metabolism*, 29(3), 379-387.

418. Castello, A., Guma, A., Sevilla, L., Furriols, M., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano, A. (1995). Regulation of GLUT5 gene expression in rat intestinal mucosa: regional distribution, circadian rhythm, perinatal development and effect of diabetes. *Biochemical Journal*, 309(1), 271-277.
419. Corpe, C. P., and Burant, C. F. (1996). Hexose transporter expression in rat small intestine: effect of diet on diurnal variations. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 271(1), G211-G216.
420. Senador, D., Shewale, S., Irigoyen, M. C., Elased, K. M., and Morris, M. (2012). Effects of restricted fructose access on body weight and blood pressure circadian rhythms. *Experimental Diabetes Research*, 2012.
421. Zhang, Z., Xin, H., and Li, M. D. (2020). Circadian rhythm of lipid metabolism in health and disease. *Small Methods*, 4(7), 1900601.
422. Lamia, K. A., Sachdeva, U. M., DiTacchio, L., Williams, E. C., Alvarez, J. G., Egan, D. F., Vasquez, D. S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R. J., Thompson, C. B., and Evans, R. M. (2009). AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science*, 326(5951), 437-440.
423. Um, J. H., Pendergast, J. S., Springer, D. A., Foretz, M., Viollet, B., Brown, A., Kim, M. K., Yamazaki, S., and Chung, J. H. (2011). AMPK regulates circadian rhythms in a tissue-and isoform-specific manner. *PloS one*, 6(3), e18450.
424. Froy, O. (2010). Metabolism and circadian rhythms—implications for obesity. *Endocrine Reviews*, 31(1), 1-24.
425. Tahara, Y., Aoyama, S., and Shibata, S. (2017). The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. *The Journal of Physiological Sciences*, 67(1), 1-10.
426. Brown, S. A., Zumbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., and Schibler, U. (2002). Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Current Biology*, 12(18), 1574-1583.
427. Leonardo-Mendonça, R. C., Martinez-Nicolas, A., de Teresa Galván, C., Ocaña-Wilhelmi, J., Rusanova, I., Guerra-Hernández, E., Escames, G., and Acuña-Castroviejo, D. (2015). The benefits of four weeks of melatonin treatment on circadian patterns in resistance-trained athletes. *Chronobiology International*, 32(8), 1125-1134.
428. Wolff, G., and Esser, K. A. (2012). Scheduled exercise phase shifts the circadian clock in skeletal muscle. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 44(9), 1663.
429. Youngstedt, S. D., Kline, C. E., Elliott, J. A., Zielinski, M. R., Devlin, T. M., and Moore, T. A. (2016). Circadian phase-shifting effects of bright light, exercise, and bright light+ exercise. *Journal of Circadian Rhythms*, 14.
430. Ferrell, J. M., and Chiang, J. Y. (2015). Circadian rhythms in liver metabolism and disease. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(2), 113-122.

431. Reinke, H., and Asher, G. (2016). Circadian clock control of liver metabolic functions. *Gastroenterology*, 150(3), 574-580.
432. Wang, H., Gu, Y., Zheng, L., Liu, L., Meng, G., Wu, H., Xia, Y., Bao, X., Shi, H., Sun, S., Wang, X., Zhou, M., Jia, Q., Song, K., Zhang, Q., and Niu, K. (2018). Association between bedtime and the prevalence of newly diagnosed non-alcoholic fatty liver disease in adults. *Liver International*, 38(12), 2277-2286.
433. Peng, K., Lin, L., Wang, Z., Ding, L., Huang, Y., Wang, P., Xu, Y., Lu, J., Xu, M., Bi, Y., Wang, W., Chen, Y., and Ning, G. (2017). Short sleep duration and longer daytime napping are associated with non-alcoholic fatty liver disease in Chinese adults. *Journal of Diabetes*, 9(9), 827-836.
434. Shostak, A., Meyer-Kovac, J., and Oster, H. (2013). Circadian regulation of lipid mobilization in white adipose tissues. *Diabetes*, 62(7), 2195-2203.
435. Cho, H., Zhao, X., Hatori, M., Ruth, T. Y., Barish, G. D., Lam, M. T., Chong, L. W., Ditacchio, L., Atkins, A. R., Glass, C. K., Liddle, C., Auwerx, J., Downes, M., Panda, S., and Evans, R. M. (2012). Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature*, 485(7396), 123-127.
436. Garaulet, M. O. J. M. J., Ordovas, J. M., and Madrid, J. A. (2010). The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. *International journal of Obesity*, 34(12), 1667-1683.
437. Gooley, J. J. (2016). Circadian regulation of lipid metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 75(4), 440-450.
438. Van Cauter, E., Polonsky, K. S., and Scheen, A. J. (1997). Roles of circadian rhythmicity and sleep in human glucose regulation. *Endocrine Reviews*, 18(5), 716-738.
439. la Fleur, S. E., Kalsbeek, A., Wortel, J., Fekkes, M. L., and Buijs, R. M. (2001). A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes*, 50(6), 1237-1243.
440. Bolli, G. B., De Feo, P., De Cosmo, S., Perriello, G., Ventura, M. M., Calcinaro, F., Lolli, C., Campbell, P., Brunetti, P., and Gerich, J. E. (1984). Demonstration of a dawn phenomenon in normal human volunteers. *Diabetes*, 33(12), 1150-1153.
441. Radziuk, J., and Pye, S. (2006). Diurnal rhythm in endogenous glucose production is a major contributor to fasting hyperglycaemia in type 2 diabetes. Suprachiasmatic deficit or limit cycle behaviour?. *Diabetologia*, 49(7), 1619-1628.
442. Saad, A., Dalla Man, C., Nandy, D. K., Levine, J. A., Bharucha, A. E., Rizza, R. A., Basu, R., Carter, R. E., Cobelli, C., and Kudva, Y. C. (2012). Diurnal pattern to insulin secretion and insulin action in healthy individuals. *Diabetes*, 61(11), 2691-2700.

443. la Fleur, S. E., Kalsbeek, A., Wortel, J., Fekkes, M. L., and Buijs, R. M. (2001). A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes*, 50(6), 1237-1243.
444. Morris, C. J., Yang, J. N., Garcia, J. I., Myers, S., Bozzi, I., Wang, W., Buxton, O. M., Shea, S. A., and Scheer, F. A. (2015). Endogenous circadian system and circadian misalignment impact glucose tolerance via separate mechanisms in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17), E2225-E2234.
445. Buckley, T. M., and Schatzberg, A. F. (2005). On the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rhythm, exemplary sleep disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(5), 3106-3114.
446. Van Raalte, D. H., and Diamant, M. (2014). Steroid diabetes: from mechanism to treatment. *The Netherlands Journal of Medicine*, 72(2), 62-72.
447. Ramracheya, R. D., Muller, D. S., Squires, P. E., Brereton, H., Sugden, D., Huang, G. C., Amial, S. A., Jones, P. M., and Persaud, S. J. (2008). Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *Journal of Pineal Research*, 44(3), 273-279.
448. Claustrat, B., Brun, J., and Chazot, G. (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*, 9(1), 11-24.
449. Møller, N., and Jørgensen, J. O. L. (2009). Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects. *Endocrine Reviews*, 30(2), 152-177.
450. Morris, C. J., Aeschbach, D., and Scheer, F. A. (2012). Circadian system, sleep and endocrinology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349(1), 91-104.
451. Spiegel, K., Knutson, K., Leproult, R., Tasali, E., and Cauter, E. V. (2005). Sleep loss: a novel risk factor for insulin resistance and Type 2 diabetes. *Journal of Applied Physiology*, 99(5), 2008-2019.
452. Lopez-Minguez, J., Gómez-Abellán, P., and Garaulet, M. (2019). Timing of breakfast, lunch, and dinner. Effects on obesity and metabolic risk. *Nutrients*, 11(11), 2624.
453. Moran-Ramos, S., Guerrero-Vargas, N. N., Mendez-Hernandez, R., Basualdo, M. D. C., Escobar, C., and Buijs, R. M. (2017). The suprachiasmatic nucleus drives day–night variations in postprandial triglyceride uptake into skeletal muscle and brown adipose tissue. *Experimental Physiology*, 102(12), 1584-1595.
454. Czeisler, C. A., Weitzman, E. D., Moore-Ede, M. C., Zimmerman, J. C., and Knauer, R. S. (1980). Human sleep: its duration and organization depend on its circadian phase. *Science*, 210(4475), 1264-1267.

455. Krauchi, K., and Wirz-Justice, A. N. N. A. (1994). Circadian rhythm of heat production, heart rate, and skin and core temperature under unmasking conditions in men. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 267(3), R819-R829.
456. Vetter, C., Dashti, H. S., Lane, J. M., Anderson, S. G., Schernhammer, E. S., Rutter, M. K., Saxena, R., and Scheer, F. A. J. L. (2018). Night shift work, genetic risk, and type 2 diabetes in the UK biobank. *Diabetes Care*, 41(4), 762-769.
457. Lee, J., Ma, K., Moulik, M., and Yechoor, V. (2018). Untimely oxidative stress in β -cells leads to diabetes—Role of circadian clock in β -cell function. *Free Radical Biology and Medicine*, 119, 69-74.
458. Perelis, M., Marcheva, B., Ramsey, K. M., Schipma, M. J., Hutchison, A. L., Taguchi, A., Peek, C. B., Hong, H., Huang, W., Omura, C., Allred, A. L., Bradfield, C. A., Dinner, A. R., Barish, G. D., and Bass, J. (2015). Pancreatic β cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion. *Science*, 350(6261).
459. Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, S., Losee-Olson, A., Easton, D. R., Jensen, R. H., Eckel, R. H., Takahashi, J. S., and Bass, J. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, 308(5724), 1043-1045.
460. Arble, D. M., Bass, J., Laposky, A. D., Vitaterna, M. H., and Turek, F. W. (2009). Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity*, 17(11), 2100-2102.
461. Zhang, G., and Cai, D. (2011). Circadian intervention of obesity development via resting-stage feeding manipulation or oxytocin treatment. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 301(5), E1004-E1012.
462. Sherman, H., Genzer, Y., Cohen, R., Chapnik, N., Madar, Z., and Froy, O. (2012). Timed high-fat diet resets circadian metabolism and prevents obesity. *The FASEB Journal*, 26(8), 3493-3502.
463. Froy, O. (2012). Circadian rhythms and obesity in mammals. *International Scholarly Research Notices*, 2012.
464. Serin, Y., and Tek, N. A. (2019). Effect of circadian rhythm on metabolic processes and the regulation of energy balance. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(4), 322-330.
465. Chatham, J. C., and Young, M. E. (2013). Regulation of myocardial metabolism by the cardiomyocyte circadian clock. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 55, 139-146.
466. Muller, J. E., Tofler, G. H., and Stone, P. H. (1989). Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation*, 79(4), 733-743.

467. Li, M., Huang, J. T., Tan, Y., Yang, B. P., and Tang, Z. Y. (2016). Shift work and risk of stroke: A meta-analysis. *International Journal of Cardiology*, 214, 370-373.
468. Havakuk, O., Zukerman, N., Flint, N., Sadeh, B., Margolis, G., Konigstein, M., Keren, G., Aviram, G., and Shmilovich, H. (2018). Shift work and the risk of coronary artery disease: a cardiac computed tomography angiography study. *Cardiology*, 139(1), 11-16.
469. Hermansson, J., Hallqvist, J., Karlsson, B., Knutsson, A., and Gillander Gådin, K. (2018). Shift work, parental cardiovascular disease and myocardial infarction in males. *Occupational Medicine*, 68(2), 120-125.
470. Jankowiak, S., Backé, E., Liebers, F., Schulz, A., Hegewald, J., Garthus-Niegel, S., Nübling, M., Blankenberg, S., Pfeiffer, N., Lackner, K. J., Beutel, M., Blettner, M., Münzel, T., Wild, P. S., Seidler, A., Letzel, S., and Latza, U. (2016). Current and cumulative night shift work and subclinical atherosclerosis: results of the Gutenberg Health Study. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 89(8), 1169-1182.
471. Manohar, S., Thongprayoon, C., Cheungpasitporn, W., Mao, M. A., and Herrmann, S. M. (2017). Associations of rotational shift work and night shift status with hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Hypertension*, 35(10), 1929-1937.
472. Alibhai, F. J., LaMarre, J., Reitz, C. J., Tsimakouridze, E. V., Kroetsch, J. T., Bolz, S. S., Shulman, A., Steinberg, S., Burris, T. P., Oudit, G. Y., and Martino, T. A. (2017). Disrupting the key circadian regulator CLOCK leads to age-dependent cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 105, 24-37.
473. Morris, C. J., Purvis, T. E., Hu, K., and Scheer, F. A. (2016). Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(10), E1402-E1411.
474. Sommer, F., and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227-238.
475. Mukherji, A., Kobiita, A., Ye, T., and Chambon, P. (2013). Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. *Cell*, 153(4), 812-827.
476. Kuang, Z., Wang, Y., Li, Y., Ye, C., Ruhn, K. A., Behrendt, C. L., Olson, E. N., and Hooper, L. V. (2019). The intestinal microbiota programs diurnal rhythms in host metabolism through histone deacetylase 3. *Science*, 365(6460), 1428-1434.
477. Weger, B. D., Gobet, C., Yeung, J., Martin, E., Jimenez, S., Betrisey, B., Foata, F., Berger, B., Balvay, A., Foussier, A., Charpagne, A., Boizet-Bonhoure, B., Chou, C. J., Naef, F., and Gachon, F. (2019). The mouse microbiome is required for sex-specific diurnal rhythms of gene expression and metabolism. *Cell Metabolism*, 29(2), 362-382.

478. Tognini, P., Murakami, M., and Sassone-Corsi, P. (2018). Interplay between microbes and the circadian clock. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(9), a028365.
479. Murakami, M., Tognini, P., Liu, Y., Eckel-Mahan, K. L., Baldi, P., and Sassone-Corsi, P. (2016). Gut microbiota directs PPAR γ -driven reprogramming of the liver circadian clock by nutritional challenge. *EMBO Reports*, 17(9), 1292-1303.
480. Thaïss, C. A., Levy, M., Korem, T., Dohnalová, L., Shapiro, H., Jaitin, D. A., David, E., Winter, D. R., Gury-BenAri, M., Tatirovsky, E., Tuganbaev, T., Federici, S., Zmora, N., Zeevi, D., Dori-Bachash, M., Pevsner-Fischer, M., Kartvelishvily, E., Brandis, A., Harmelin, A., Shibolet, O., Halpem, Z., Honda, K., Amit, I., Segal, E., Elinav, E. (2016). Microbiota diurnal rhythmicity programs host transcriptome oscillations. *Cell*, 167(6), 1495-1510.
481. Hoogerwerf, W. A. (2010). Role of clock genes in gastrointestinal motility. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(3), G549-G555.
482. Johnson, C. H., Stewart, P. L., and Egli, M. (2011). The cyanobacterial circadian system: from biophysics to bioevolution. *Annual Review of Biophysics*, 40, 143-167.
483. Cohen, S. E., and Golden, S. S. (2015). Circadian rhythms in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(4), 373-385.
484. Hirota, T., and Kay, S. A. (2015). Identification of small-molecule modulators of the circadian clock. *Methods in Enzymology*, 551, 267-282.
485. Shibata, S., and Tahara, Y. (2014). Circadian rhythm and exercise. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 3(1), 65-72.
486. Sato, T., Ida, T., and Kojima, M. (2017). Role of biological rhythms in the performance of physical activity. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 6(3), 125-134.
487. Lähteenmäki, R., Puustinen, J., Vahlberg, T., Lyles, A., Neuvonen, P. J., Partinen, M., Räihä, S.-L., and Kivelä, S. L. (2014). Melatonin for sedative withdrawal in older patients with primary insomnia: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(6), 975-985.
488. Chang, Y. S., Lin, M. H., Lee, J. H., Lee, P. L., Dai, Y. S., Chu, K. H., Sun, C., Lin, Y.-T., Wang, L.-C., Yu, H.-H., Yang, Y.-H., Chen, C.-A., Wan, K.-S., and Chiang, B. L. (2016). Melatonin supplementation for children with atopic dermatitis and sleep disturbance: a randomized clinical trial. *JAMA Pediatrics*, 170(1), 35-42.
489. Bartlett, D. J., Biggs, S. N., and Armstrong, S. M. (2013). Circadian rhythm disorders among adolescents: assessment and treatment options. *Medical Journal of Australia*, 199, S16-S20.

490. Amstrup, A. K., Sikjaer, T., Mosekilde, L., and Rejnmark, L. (2015). The effect of melatonin treatment on postural stability, muscle strength, and quality of life and sleep in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, 14(1), 1-8.
491. Herdegen, J. J. (2002). Intensive care unit sleep disruption: can the cycle be restored?. *Critical Care Medicine*, 30(3), 709-710.
492. Oike, H., Oishi, K., and Kobori, M. (2014). Nutrients, clock genes, and chrononutrition. *Current Nutrition Reports*, 3(3), 204-212.
493. Schroeder, A. M., and Colwell, C. S. (2013). How to fix a broken clock. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(11), 605-619.
494. Chaix, A., Zarrinpar, A., Miu, P., and Panda, S. (2014). Time-restricted feeding is a preventative and therapeutic intervention against diverse nutritional challenges. *Cell Metabolism*, 20(6), 991-1005.
495. Jakubowicz, D., Barnea, M., Wainstein, J., and Froy, O. (2013). High caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women. *Obesity*, 21(12), 2504-2512.
496. Markwald, R. R., Melanson, E. L., Smith, M. R., Higgins, J., Perreault, L., Eckel, R. H., and Wright, K. P. (2013). Impact of insufficient sleep on total daily energy expenditure, food intake, and weight gain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(14), 5695-5700.
497. Nakao, R., Nikawa, T., and Oishi, K. (2017). The skeletal muscle circadian clock: current insights. *ChronoPhysiology and Therapy*, 7, 47-57.
498. Buxton, O. M., Lee, C. W., L'Hermite-Balériaux, M., Turek, F. W., and Van Cauter, E. (2003). Exercise elicits phase shifts and acute alterations of melatonin that vary with circadian phase. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(3), R714-R724.
499. Reid, K. J., Baron, K. G., Lu, B., Naylor, E., Wolfe, L., and Zee, P. C. (2010). Aerobic exercise improves self-reported sleep and quality of life in older adults with insomnia. *Sleep Medicine*, 11(9), 934-940.
500. Sumlu, E., Bostancı, A., Sadi, G., Alçıgır, M. E., and Akar, F. (2020). Lactobacillus plantarum improves lipogenesis and IRS-1/AKT/eNOS signalling pathway in the liver of high-fructose-fed rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-9.
501. Gumede, N. M., Lembede, B. W., Nkomozepi, P., Brooksbank, R. L., Erlwanger, K. H., and Chivandi, E. (2020). β -Sitosterol mitigates the development of high-fructose diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in growing male Sprague-Dawley rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 98(1), 44-50.
502. Dziadek, K., Kopeć, A., Piątkowska, E., and Leszczyńska, T. (2019). High-fructose diet-induced metabolic disorders were counteracted by the intake of fruit and leaves of sweet cherry in wistar rats. *Nutrients*, 11(11), 2638.

503. Sun, S., Hanzawa, F., Umeki, M., Ikeda, S., Mochizuki, S., and Oda, H. (2018). Time-restricted feeding suppresses excess sucrose-induced plasma and liver lipid accumulation in rats. *PloS one*, 13(8), e0201261.
504. de Moura, R. F., Ribeiro, C., de Oliveira, J. A., Stevanato, E., and de Mello, M. A. R. (2008). Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *British Journal of Nutrition*, 101(8), 1178-1184.
505. Jang, C., Hui, S., Lu, W., Cowan, A. J., Morscher, R. J., Lee, G., Liu, W., Tesz, G. J., Birnbaum, M. J., and Rabinowitz, J. D. (2018). The small intestine converts dietary fructose into glucose and organic acids. *Cell Metabolism*, 27(2), 351-361.
506. Al-Muzafar, H. M., and Amin, K. A. (2017). Probiotic mixture improves fatty liver disease by virtue of its action on lipid profiles, leptin, and inflammatory biomarkers. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1-9.
507. Mirpuri, J., Sotnikov, I., Myers, L., Denning, T. L., Yarovinsky, F., Parkos, C. A., Denning, P. W., and Louis, N. A. (2012). Lactobacillus rhamnosus (LGG) regulates IL-10 signaling in the developing murine colon through upregulation of the IL-10R2 receptor subunit. *PLoS One*, 7(12), e51955.
508. Fong, F. L. Y., Kirjavainen, P., Wong, V. H. Y., and El-Nezami, H. (2015). Immunomodulatory effects of Lactobacillus rhamnosus GG on dendritic cells, macrophages and monocytes from healthy donors. *Journal of Functional Foods*, 13, 71-79.
509. Ritze, Y., Bárdos, G., Claus, A., Ehrmann, V., Bergheim, I., Schwartz, A., and Bischoff, S. C. (2014). Lactobacillus rhamnosus GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *PloS one*, 9(1), e80169.
510. Zhao, Y., Liu, S., Tang, Y., You, T., and Xu, H. (2021). Lactobacillus rhamnosus GG ameliorated long-term exposure to TiO₂ nanoparticles induced microbiota-mediated liver and colon inflammation and fructose-caused metabolic abnormality in metabolism syndrome mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(34), 9788-9799.
511. Lambertz, J., Weiskirchen, S., Landert, S., and Weiskirchen, R. (2017). Fructose: a dietary sugar in crosstalk with microbiota contributing to the development and progression of non-alcoholic liver disease. *Frontiers in Immunology*, 8, 1159.
512. Nyakudya, T. T., Mukwevho, E., Nkomozepi, P., and Erlwanger, K. H. (2018). Neonatal intake of oleanolic acid attenuates the subsequent development of high fructose diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 9(5), 500-510.
513. Li, C., Nie, S. P., Zhu, K. X., Ding, Q., Li, C., Xiong, T., and Xie, M. Y. (2014). Lactobacillus plantarum NCU116 improves liver function, oxidative stress and lipid metabolism in rats with high fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease. *Food & Function*, 5(12), 3216-3223.

514. Abdulla, M. H., Sattar, M. A., Abdullah, N. A., Khan, M. A. H., Swarup, K. R. A., and Johns, E. J. (2011). The contribution of α 1B-adrenoceptor subtype in the renal vasculature of fructose-fed Sprague–Dawley rats. *European Journal of Nutrition*, 50(4), 251-260.
515. Poudyal, H., Campbell, F., and Brown, L. (2010). Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate–, high fat–fed rats. *The Journal of Nutrition*, 140(5), 946-953.
516. Novelli, E. L. B., Diniz, Y. S., Galhardi, C. M., Ebaid, G. M. X., Rodrigues, H. G., Mani, F., Fernandes, A. H. H., Cicogna, A. C., and Novelli Filho, J. L. V. B. (2007). Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*, 41(1), 111-119.
517. Karatas, F., Karatepe, M., and Baysar, A. H. M. E. T. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 311(1), 76-79.
518. Yilmaz, Ö., Keser, S., Tuzcu, M., Güvenc, M., Cetintas, B., Irtegün, S., Taştan, H., and Sahin, K. (2009). A practical HPLC method to measure reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations in animal tissues. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(2), 343-347.
519. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
520. Kohsaka, A., and Bass, J. (2007). A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(1), 4-11.
521. Dallmann, R., Viola, A. U., Tarokh, L., Cajochen, C., and Brown, S. A. (2012). The human circadian metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7), 2625-2629.
522. Eckel-Mahan, K., and Sassone-Corsi, P. (2009). Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(5), 462-467.
523. Zhou, B., Zhang, Y., Zhang, F., Xia, Y., Liu, J., Huang, R., Wang, Y., Hu, Y., Wu, J., Dai, C., Wang, H., Tu, Y., Peng, X., Wang, Y., and Zhai, Q. (2014). CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity by SIRT1. *Hepatology*, 59(6), 2196-2206.
524. Doi, R., Oishi, K., and Ishida, N. (2010). CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of Gys2. *Journal of Biological Chemistry*, 285(29), 22114-22121.
525. Grimaldi, B., Bellet, M. M., Katada, S., Astarita, G., Hirayama, J., Amin, R. H., Granneman, J. G., Piomelli, D., Leff, T., and Sassone-Corsi, P. (2010). PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR γ . *Cell Metabolism*, 12(5), 509-520.

526. Bray, M. S., Ratcliffe, W. F., Grenett, M. H., Brewer, R. A., Gamble, K. L., and Young, M. E. (2013). Quantitative analysis of light-phase restricted feeding reveals metabolic dyssynchrony in mice. *International Journal of Obesity*, 37(6), 843-852.
527. Wu, T., Jin, Y., Kato, H., and Fu, Z. (2008). Light and food signals cooperate to entrain the rat pineal circadian system. *Journal of Neuroscience Research*, 86(14), 3246-3255.
528. Sant'Diniz, Y., Faine, L. A., Galhardi, C. M., Rodrigues, H. G., Ebaid, G. X., Burneiko, R. C., Cicogna, A. C., and Novelli, E. L. B. (2005). Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition*, 21(6), 749-755.
529. Commerford, S. R., Pagliassotti, M. J., Melby, C. L., Wei, Y., Gayles, E. C., and Hill, J. O. (2000). Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 279(4), E875-E885.
530. Friedman, M. I. (1990). Body fat and the metabolic control of food intake. *International Journal of Obesity*, 14, 53-66.
531. Mamikutty, N., Thent, Z. C., Sapri, S. R., Sahrudin, N. N., Mohd Yusof, M. R., Haji and Suhaimi, F. (2014). The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed Research International*, 2014.
532. Aguilera-Mendez, A., Hernández-Equihua, M. G., Rueda-Rocha, A. C., Guajardo-López, C., Nieto-Aguilar, R., Serrato-Ochoa, D., Herrera, L. F. R., and Guzmán-Nateras, J. A. (2018). Protective effect of supplementation with biotin against high-fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Nutrition Research*, 57, 86-96.
533. Chicco, A., Bernal, C., Soria, A., Giangrossi, G., and Lombardo, Y. (1999). Dietary effects of partial or total substitution of sucrose for starch on glucose and lipid metabolism in dyslipidemic rats. *Nutrition Research*, 19(2), 281-293.
534. Duffey, K. J., and Popkin, B. M. (2007). Shifts in patterns and consumption of beverages between 1965 and 2002. *Obesity*, 15(11), 2739-2747.
535. Francisqueti, F. V., Santos, K. C., Ferron, A. J. T., Lo, A. T. C., Minatel, I. O., Campos, D. H. S., Ferreira, A. L. A., and Corrêa, C. R. (2016). Fructose: Toxic effect on cardiorenal risk factors and redox state. *SAGE Open Medicine*, 4, 1-6.
536. Wagnerberger, S., Spruss, A., Kanuri, G., Stahl, C., Schröder, M., Vetter, W., Bischoff, S. C., and Bergheim, I. (2013). *Lactobacillus casei* Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: a mouse model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(3), 531-538.

537. Sellmann, C., Priebs, J., Landmann, M., Degen, C., Engstler, A. J., Jin, C. J., Gärttner S., Spruss, A., Huber, O., and Bergheim, I. (2015). Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(11), 1183-1192.
538. Schultz, A., Neil, D., Aguila, M. B., and Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2013). Hepatic adverse effects of fructose consumption independent of overweight/obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11), 21873-21886.
539. Forshee, R. A., Storey, M. L., Allison, D. B., Glinsmann, W. H., Hein, G. L., Lineback, D. R., Miller, S. A., Nicklas, T. A., Weaver, G. A., and White, J. S. (2007). A critical examination of the evidence relating high fructose corn syrup and weight gain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(6), 561-582.
540. Hsieh, F. C., Lee, C. L., Chai, C. Y., Chen, W. T., Lu, Y. C., and Wu, C. S. (2013). Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutrition & Metabolism*, 10(1), 1-14.
541. Somabhai, C. A., Raghuvanshi, R., and Nareshkumar, G. (2016). Genetically engineered *Escherichia coli* Nissle 1917 synbiotics reduce metabolic effects induced by chronic consumption of dietary fructose. *PloS one*, 11(10), e0164860.
542. Kim, S. W., Park, K. Y., Kim, B., Kim, E., and Hyun, C. K. (2013). *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(2), 258-263.
543. Ji, Y. S., Kim, H. N., Park, H. J., Lee, J. E., Yeo, S. Y., Yang, J. S., Park, S. Y., Yoon, H. S., Cho, G. S., Franz, C. M., Bomba, A., Shin, H.K., and Holzapfel, W. H. (2012). Modulation of the murine microbiome with a concomitant anti-obesity effect by *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus sakei* NR28. *Beneficial Microbes*, 3(1), 13-22.
544. Ackerman, Z., Oron-Herman, M., Grozovski, M., Rosenthal, T., Pappo, O., Link, G., and Sela, B. A. (2005). Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension*, 45(5), 1012-1018.
545. de Castro, U. G. M., Silva, M. E., de Lima, W. G., Campagnole-Santos, M. J., and Alzamora, A. C. (2013). Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. *Lipids in Health and Disease*, 12(1), 1-11.
546. Salomone, F., Zelber-Sagi, S., Galvano, F., and Fabbrini, E. (2015). Non-alcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and clinical management. *BioMed Research International*, 2015: 153276.

547. Alisi, A., Bedogni, G., Baviera, G., Giorgio, V., Porro, E., Paris, C., Giammaria, P., Reali, L., Anania, F., and Nobili, V. (2014). Randomised clinical trial: the beneficial effects of VSL# 3 in obese children with non-alcoholic steatohepatitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 39(11), 1276-1285.
548. Pérez-Corredor, P. A., Gutiérrez-Vargas, J. A., Ciro-Ramírez, L., Balcazar, N., and Cardona-Gómez, G. P. (2020). High fructose diet-induced obesity worsens post-ischemic brain injury in the hippocampus of female rats. *Nutritional Neuroscience*, 1-15.
549. Hsiao, T. J., Chen, J. C., and Wang, J. D. (2004). Insulin resistance and ferritin as major determinants of nonalcoholic fatty liver disease in apparently healthy obese patients. *International Journal of Obesity*, 28(1), 167-172.
550. Thamer, C., Machann, J., Haap, M., Stefan, N., Heller, E., Schnödt, B., Stumvoll, M., Claussen, C., Fritsche, A., Schick, F., and Haring, H. (2004). Intrahepatic lipids are predicted by visceral adipose tissue mass in healthy subjects. *Diabetes Care*, 27(11), 2726-2729.
551. Acheson, K. J. (2004). Carbohydrate and weight control: where do we stand?. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 7(4), 485-492.
552. Kitagawa, A., Ohta, Y., and Ohashi, K. (2012). Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats. *Journal of Pineal Research*, 52(4), 403-413.
553. Kawasaki, T., Igarashi, K., Koeda, T., Sugimoto, K., Nakagawa, K., Hayashi, S., Yamaji, R., Inui, H., Fukusato, T., and Yamanouchi, T. (2009). Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *The Journal of Nutrition*, 139(11), 2067-2071.
554. Ferreira-Santos, P., Aparicio, R., Carrón, R., Montero, M. J., and Sevilla, M. Á. (2020). Lycopene-supplemented diet ameliorates metabolic syndrome induced by fructose in rats. *Journal of Functional Foods*, 73, 104098.
555. Mayes, P. A. (1993). Intermediary metabolism of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58(5), 754S-765S.
556. Marriott, B. P., Cole, N., and Lee, E. (2009). National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *The Journal of Nutrition*, 139(6), 1228S-1235S.
557. Kanerva, N., Sandboge, S., Kaartinen, N. E., Männistö, S., and Eriksson, J. G. (2014). Higher fructose intake is inversely associated with risk of nonalcoholic fatty liver disease in older Finnish adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100(4), 1133-1138.
558. Te Morenga, L., Mallard, S., and Mann, J. (2013). Dietary sugars and body weight: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. *British Medical Journal*, 346: e7492.

559. Zhao, Q., Li, L., Zhu, Y., Hou, D., Li, Y., Guo, X., Wang, Y., Olatunji, O. J., Wan, P. and Gong, K. (2020). Kukoamine B ameliorate insulin resistance, oxidative stress, inflammation and other metabolic abnormalities in high-fat/high-fructose-fed rats. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 13, 1843.
560. Zhou, J., and Qin, G. (2012). Adipocyte dysfunction and hypertension. *American Journal of Cardiovascular Disease*, 2(2), 143.
561. Kershaw, E. E., and Flier, J. S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(6), 2548-2556.
562. Bray, G. A. (2012). Fructose and risk of cardiometabolic disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 14(6), 570-578.
563. Hallfrisch, J. (1990). Metabolic effects of dietary fructose. *The FASEB Journal*, 4(9), 2652-2660.
564. Spruss, A., and Bergheim, I. (2009). Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(9), 657-662.
565. Korkmaz, O. A., Sumlu, E., Koca, H. B., Pektas, M. B., Kocabas, A., Sadi, G., and Akar, F. (2019). Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus helveticus* on renal insulin signaling, inflammatory markers, and glucose transporters in high-fructose-fed rats. *Medicina*, 55(5), 207.
566. Allegra, M., Reiter, R. J., Tan, D. X., Gentile, C., Tesoriere, L., and Livrea, M. A. (2003). The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *Journal of Pineal Research*, 34(1), 1-10.
567. Solís-Muñoz, P., Solís-Herruzo, J. A., Fernández-Moreira, D., Gómez-Izquierdo, E., García-Consuegra, I., Muñoz-Yagüe, T., and García Ruiz, I. (2011). Melatonin improves mitochondrial respiratory chain activity and liver morphology in ob/ob mice. *Journal of Pineal Research*, 51(1), 113-123.
568. J Reiter, R., A Rosales-Corral, S., C Manchester, L., Liu, X., and Tan, D. X. (2014). Melatonin in the biliary tract and liver: health implications. *Current Pharmaceutical Design*, 20(30), 4788-4801.
569. Vinogradova, I. A., Anisimov, V. N., Bukalev, A. V., Ilyukha, V. A., Khizhkin, E. A., Lotosh, T. A., Semenchenko, A. V., and Zabezhinski, M. A. (2010). Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in young but not in old rats. *Aging (Albany NY)*, 2(2), 82.
570. Wideman, C. H., and Murphy, H. M. (2009). Constant light induces alterations in melatonin levels, food intake, feed efficiency, visceral adiposity, and circadian rhythms in rats. *Nutritional Neuroscience*, 12(5), 233-240.

571. Lutfi, E., Basili, D., Falcinelli, S., Morillas, L., Carnevali, O., Capilla, E., and Navarro, I. (2021). The probiotic *Lactobacillus rhamnosus* mimics the dark-driven regulation of appetite markers and melatonin receptors' expression in zebrafish (*Danio rerio*) larvae: Understanding the role of the gut microbiome. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 110634.
572. Zaitone, S., Hassan, N., El-Orabi, N., and El-Awady, E. S. (2011). Pentoxifylline and melatonin in combination with pioglitazone ameliorate experimental non-alcoholic fatty liver disease. *European Journal of Pharmacology*, 662(1-3), 70-77.
573. Paschos, P., and Paletas, K. (2009). Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia*, 13(1), 9.
574. Bray, G. A., Nielsen, S. J., and Popkin, B. M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), 537-543.
575. Tran, L. T., Yuen, V. G., and McNeill, J. H. (2009). The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 332(1), 145-159.
576. D'Angelo, G., Elmarakby, A. A., Pollock, D. M., and Stepp, D. W. (2005). Fructose feeding increases insulin resistance but not blood pressure in Sprague-Dawley rats. *Hypertension*, 46(4), 806-811.
577. Yadav, H., Jain, S., and Sinha, P. R. (2007). Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*, 23(1), 62-68.
578. Zhang, Y., Wang, L., Zhang, J., Li, Y., He, Q., Li, H., Guo, X., Guo, J., and Zhang, H. (2014). Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang ameliorates high-fructose-induced impaired glucose tolerance in hyperinsulinemia rats. *European Journal of Nutrition*, 53(1), 221-232.
579. Nagorny, C., and Lyssenko, V. (2012). Tired of diabetes genetics? Circadian rhythms and diabetes: the MTNR1B story?. *Current Diabetes Reports*, 12(6), 667-672.
580. Binienda, A., Twardowska, A., Makaro, A., and Salaga, M. (2020). Dietary Carbohydrates and Lipids in the Pathogenesis of Leaky Gut Syndrome: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 8368.
581. Sapone, A., De Magistris, L., Pietzak, M., Clemente, M. G., Tripathi, A., Cucca, F., Lampis, R., Kryszak, D., Carteni, M., Generoso, M., Lafusco, D., Prisco, F., Laghi, F., Riegler, G., Carratu, R., Counts, D., and Fasano, A. (2006). Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes*, 55(5), 1443-1449.
582. Moreno-Navarrete, J. M., Sabater, M., Ortega, F., Ricart, W., and Fernandez-Real, J. M. (2012). Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. *PloS one*, 7(5), e37160.

583. Hendy, O. M., Elsabaawy, M. M., Aref, M. M., Khalaf, F. M., Oda, A. M. A., and El Shazly, H. M. (2017). Evaluation of circulating zonulin as a potential marker in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Apmis*, 125(7), 607-613.
584. Do, M. H., Lee, E., Oh, M. J., Kim, Y., and Park, H. Y. (2018). High-glucose or-fructose diet cause changes of the gut microbiota and metabolic disorders in mice without body weight change. *Nutrients*, 10(6), 761.
585. Seki, K., Kitade, M., Nishimura, N., Kaji, K., Asada, K., Namisaki, T., Moriya, K., Kawaratani, H., Okura, Y., Takaya, H., Sawada, Y., Sato, S., Nakanishi, K., and Yoshiji, H. (2018). Oral administration of fructose exacerbates liver fibrosis and hepatocarcinogenesis via increased intestinal permeability in a rat steatohepatitis model. *Oncotarget*, 9(47), 28638.
586. Cho, Y. E., Kim, D. K., Seo, W., Gao, B., Yoo, S. H., and Song, B. J. (2021). Fructose promotes leaky gut, endotoxemia, and liver fibrosis through ethanol-inducible cytochrome P450- 2E1-mediated oxidative and nitrative stress. *Hepatology*, 73(6), 2180-2195.
587. Jin, R., Willment, A., Patel, S. S., Sun, X., Song, M., Mannery, Y. O., Kosters, A., McClain, C. J., and Vos, M. B. (2014). Fructose induced endotoxemia in pediatric nonalcoholic Fatty liver disease. *International Journal of Hepatology*, 2014.
588. Johnson-Henry, K. C., Donato, K. A., Shen-Tu, G., Gordanpour, M., and Sherman, P. M. (2008). Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infection and Immunity*, 76(4), 1340-1348.
589. Wagnerberger, S., Spruss, A., Kanuri, G., Volynets, V., Stahl, C., Bischoff, S. C., and Bergheim, I. (2012). Toll-like receptors 1–9 are elevated in livers with fructose-induced hepatic steatosis. *British Journal of Nutrition*, 107(12), 1727-1738.
590. Rivero-Gutiérrez, B., Gámez-Belmonte, R., Suárez, M. D., Lavín, J. L., Aransay, A. M., Olivares, M., Martinez-Augustin, O., de Medina, F. S., and Zarzuelo, A. (2017). A synbiotic composed of Lactobacillus fermentum CECT5716 and FOS prevents the development of fatty acid liver and glycemic alterations in rats fed a high fructose diet associated with changes in the microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(8), 1600622.
591. Cho, Y. E., Kim, D. K., Seo, W., Gao, B., Yoo, S. H., and Song, B. J. (2019). Fructose promotes leaky gut, endotoxemia and liver fibrosis through CYP2E1-mediated oxidative and nitrative stress. *Hepatology*, 73(6), 2180-2195.
592. Feuers, R. J. (1998). The Effects of Dietary Restriction on Mitochondrial Dysfunction in Aging a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 192-201.
593. Esposito, L. A., Melov, S., Panov, A., Cottrell, B. A., and Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), 4820-4825.

594. Nishiyama, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., Yoshida, N., and Imaizumi, T. (1998). Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *American Heart Journal*, 135(1), 115-120.
595. Xin, J., Zeng, D., Wang, H., Ni, X., Yi, D., Pan, K., and Jing, B. (2014). Preventing non-alcoholic fatty liver disease through *Lactobacillus johnsonii* BS15 by attenuating inflammation and mitochondrial injury and improving gut environment in obese mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6817-6829.
596. Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., and Prajapati, J. (2015). Probiotics as potential antioxidants: a systematic review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(14), 3615-3626.
597. Miller, A., and Adeli, K. (2008). Dietary fructose and the metabolic syndrome. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24(2), 204-209.
598. Zhao, Z. H., Lai, J. K. L., Qiao, L., and Fan, J. G. (2019). Role of gut microbial metabolites in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Digestive Diseases*, 20(4), 181-188.
599. Martarelli, D., Verdenelli, M. C., Scuri, S., Cocchioni, M., Silvi, S., Cecchini, C., and Pompei, P. (2011). Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. *Current Microbiology*, 62(6), 1689-1696.
600. Sun, J., Hu, X. L., Le, G. W., and Shi, Y. H. (2013). Inhibition of Fe-induced colon oxidative stress by lactobacilli in mice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 209-216.
601. Grompone, G., Martorell, P., Llopis, S., González, N., Genovés, S., Mulet, A. P., Fernandez-Calero, T., Tiscornia, I., Bollati-Fogolin, M., Chambaud, I., Foligne, B., Montserrat, A., and Ramon, D. (2012). Anti-inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects against oxidative stress and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, 7(12), e52493.
602. Vong, L., Lorentz, R. J., Assa, A., Glogauer, M., and Sherman, P. M. (2014). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* inhibits the formation of neutrophil extracellular traps. *The Journal of Immunology*, 192(4), 1870-1877.
603. Silva, M., Jacobus, N. V., Deneke, C., and Gorbach, S. L. (1987). Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31(8), 1231-1233.
604. Seth, A., Yan, F., Polk, D. B., and Rao, R. K. (2008). Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC-and MAP kinase-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294(4), G1060-G1069.

605. Lee, K. S., Buck, M., Houglum, K., and Chojkier, M. (1995). Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(5), 2461-2468.
606. Korkmaz, Ö. A., Sadi, G., Kocabaş, A., Yıldırım, O. G., Sumlu, E., Koca, H. B., and Nalbantoğlu, B. (2019). Lactobacillus helveticus and Lactobacillus plantarum modulate renal antioxidant status in a rat model of fructose-induced metabolic syndrome. *Archives of Biological Sciences*, 1-14.
607. Park, E. J., Lee, Y. S., Kim, S. M., Park, G. S., Lee, Y. H., Jeong, D. Y., Kang, J., and Lee, H. J. (2020). Beneficial effects of Lactobacillus plantarum strains on non-alcoholic fatty liver disease in high fat/high fructose diet-fed rats. *Nutrients*, 12(2), 542.
608. Yang, T., Owen, J. L., Lightfoot, Y. L., Kladde, M. P., and Mohamadzadeh, M. (2013). Microbiota impact on the epigenetic regulation of colorectal cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 19(12), 714-725.
609. Hariri, M., Salehi, R., Feizi, A., Mirlohi, M., Ghiasvand, R., and Habibi, N. (2015). A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial on probiotic soy milk and soy milk: effects on epigenetics and oxidative stress in patients with type II diabetes. *Genes & Nutrition*, 10(6), 1-8.
610. Armutcu, F., Coskun, Ö., Gürel, A., Kanter, M., Can, M., Ucar, F., and Unalacak, M. (2005). Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clinical Biochemistry*, 38(6), 540-547.
611. Kanat, N., and Akdemir, S. (2014). Bakterilerde glutatyon ve önemi. *Sakarya University Journal of Science*, 18(2), 111-117.
612. Stenvers, D. J., Scheer, F. A., Schrauwen, P., la Fleur, S. E., and Kalsbeek, A. (2019). Circadian clocks and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(2), 75-89.
613. Mattis, J., and Sehgal, A. (2016). Circadian rhythms, sleep, and disorders of aging. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 27(4), 192-203.
614. Kartlaşmış, K., Kökbaş, U., Sanna, B., Alparslan, M. M., and Kayrın, L. (2017). Sirkadiyen Saatin Epigenetikle İlişkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 26(1), 50-62.
615. van der Veen, D. R., Le Minh, N., Gos, P., Arneric, M., Gerkema, M. P., and Schibler, U. (2006). Impact of behavior on central and peripheral circadian clocks in the common vole *Microtus arvalis*, a mammal with ultradian rhythms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), 3393-3398.
616. Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S., and Hogenesch, J. B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109(3), 307-320.

617. Shimba, S., Ogawa, T., Hitosugi, S., Ichihashi, Y., Nakadaira, Y., Kobayashi, M., Tezuka, M., Kosuge, Y., Ishige, K., Ito, Y., Komiyama, K., Okamatsu-Ogura, Y., Kimura, K., and Saito, M. (2011). Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. *PloS one*, 6(9), e25231.
618. Pan, X., Queiroz, J., and Hussain, M. M. (2020). Nonalcoholic fatty liver disease in CLOCK mutant mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(8).
619. Bugge, A., Feng, D., Everett, L. J., Briggs, E. R., Mullican, S. E., Wang, F., Jager, J., and Lazar, M. A. (2012). Rev-erba and Rev-erbβ coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes & Development*, 26(7), 657-667.
620. Özbayer, C., and Değirmenci, İ. (2011). Sirkadiyen saat, hücre döngüsü ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*, 38(4), 514-518.
621. Zhang, D. M., Jiao, R. Q., and Kong, L. D. (2017). High dietary fructose: direct or indirect dangerous factors disturbing tissue and organ functions. *Nutrients*, 9(4), 335.
622. Ebert, K., and Witt, H. (2016). Fructose malabsorption. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3(1), 1-5.
623. Montagner, A., Korecka, A., Polizzi, A., Lippi, Y., Blum, Y., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier-Stein, A., Burcelin, R., Yen, Y.-C., Je, H. S., Al-Asmakh, M., Mithieux, G., Arulampalam, V., Lagarrigue, S., Guillou, H., Pettersson, S., and Wahli, W. (2016). Hepatic circadian clock oscillators and nuclear receptors integrate microbiome-derived signals. *Scientific Reports*, 6(1), 1-15.
624. Zhang, D., Zhang, L., Zheng, Y., Yue, F., Russell, R. D., and Zeng, Y. (2014). Circulating zonulin levels in newly diagnosed Chinese type 2 diabetes patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 106(2), 312-318.
625. Al-Sadi, R., Ye, D., Boivin, M., Guo, S., Hashimi, M., Ereifej, L., and Ma, T. Y. (2014). Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PloS one*, 9(3), e85345.
626. Sirin, F. B., Korkmaz, H., Torus, B., Bozkurt, M., and Doguc, D. K. (2021). The role of zonulin in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Turkish Journal of Biochemistry*. 46(3), 317-322.
627. Mörkl, S., Lackner, S., Meinitzer, A., Mangge, H., Lehofer, M., Halwachs, B., Gorkiewicz, G., Kashofer, K., Painold, A., Holl, A. K., Bengesser, S. A., Müller, W., Holzer, P., and Holasek, S. J. (2018). Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women. *European Journal of Nutrition*, 57(8), 2985-2997.
628. Farhadi, A., Gundlapalli, S., Shaikh, M., Frantzides, C., Harrell, L., Kwasny, M. M., and Keshavarzian, A. (2008). Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non- alcoholic steatohepatitis. *Liver International*, 28(7), 1026-1033.

629. Tripathi, A., Lammers, K. M., Goldblum, S., Shea-Donohue, T., Netzel-Arnett, S., Buzza, M. S., Antalis, T. M., Vogel, S. N., Zhao, A., Yang, S., Arrietta, M.-C., Meddings, J. B., and Fasano, A. (2009). Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(39), 16799-16804.
630. Smecuol, E., Sugai, E., Niveloni, S., Vázquez, H., Pedreira, S., Mazure, R., Moreno, M. L., Label, M., Maurino, E., Fasano, A., Meddings, J., and Bai, J. C. (2005). Permeability, zonulin production, and enteropathy in dermatitis herpetiformis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3(4), 335-341.
631. Hansen, D., Dendale, P., Beelen, M., Jonkers, R. A., Mullens, A., Corluy, L., Meeusen, R., and van Loon, L. J. (2010). Plasma adipokine and inflammatory marker concentrations are altered in obese, as opposed to non-obese, type 2 diabetes patients. *European Journal of Applied Physiology*, 109(3), 397-404.
632. Lv, W. J., Liu, C., Yu, L. Z., Zhou, J. H., Li, Y., Xiong, Y., Guo, A., Chao, L., Qu, Q., Wei, G., Tang, X., Yin, Y., and Guo, S. N. (2020). Melatonin alleviates neuroinflammation and metabolic disorder in DSS-induced depression rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
633. Lamia, K. A., Storch, K. F., and Weitz, C. J. (2008). Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), 15172-15177.
634. Reddy, A. B., Karp, N. A., Maywood, E. S., Sage, E. A., Deery, M., O'Neill, J. S., Wong, G. K. Y., Chesham, J., Odell, M., Lilley, K. S., Kyriacou, C. P., and Hastings, M.H. (2006). Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Current Biology*, 16(11), 1107-1115.
635. Minemura, M., Shimizu, Y. (2015). Gut microbiota and liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 21(6), 1691.
636. Nishida, K., Sawada, D., Kawai, T., Kuwano, Y., Fujiwara, S., and Rokutan, K. (2017). Para-psychobiotic *Lactobacillus gasseri* CP 2305 ameliorates stress-related symptoms and sleep quality. *Journal of Applied Microbiology*, 123(6), 1561-1570.
637. Marotta, A., Sarno, E., Del Casale, A., Pane, M., Mogna, L., Amoroso, A., Felis, G., E., and Fiorio, M. (2019). Effects of probiotics on cognitive reactivity, mood, and sleep quality. *Frontiers in Psychiatry*, 10, 164.
638. Dinan, T. G., Stanton, C., and Cryan, J. F. (2013). Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biological Psychiatry*, 74(10), 720-726.
639. Van Cauter, E., Blackman, J. D., Roland, D., Spire, J. P., Refetoff, S., and Polonsky, K. S. (1991). Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *The Journal of Clinical Investigation*, 88(3), 934-942.
640. Wilking, M., Ndiaye, M., Mukhtar, H., and Ahmad, N. (2013). Circadian rhythm connections to oxidative stress: implications for human health. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(2), 192-208.

641. Oishi, K., Atsumi, G. I., Sugiyama, S., Kodomari, I., Kasamatsu, M., Machida, K., and Ishida, N. (2006). Disrupted fat absorption attenuates obesity induced by a high-fat diet in Clock mutant mice. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 580(1), 127-130.
642. Rudic, R. D., McNamara, P., Curtis, A. M., Boston, R. C., Panda, S., Hogenesch, J. B., and FitzGerald, G. A. (2004). BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biology*, 2(11), e377.
643. Kennaway, D. J., Varcoe, T. J., Voultsios, A., and Boden, M. J. (2013). Global loss of bmal1 expression alters adipose tissue hormones, gene expression and glucose metabolism. *PloS one*, 8(6), e65255.
644. Chapnik, N., Rozenblit-Susan, S., Genzer, Y., and Froy, O. (2016). Differential effect of fructose on fat metabolism and clock gene expression in hepatocytes vs. myotubes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 77, 35-40.
645. Tappy, L., Lê, K. A., Tran, C., and Paquot, N. (2010). Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition*, 26(11-12), 1044-1049.
646. Yamajuku, D., Okubo, S., Haruma, T., Inagaki, T., Okuda, Y., Kojima, T., Noutomi, K., Hashimoto, S., and Oda, H. (2009). Regular feeding plays an important role in cholesterol homeostasis through the liver circadian clock. *Circulation Research*, 105(6), 545-548.
647. Yamajuku, D., Inagaki, T., Haruma, T., Okubo, S., Kataoka, Y., Kobayashi, S., Ikegami, K., Laurent, T., Kojima, T., Noutomi, K., Hashimoto, S., and Oda, H. (2012). Real-time monitoring in three-dimensional hepatocytes reveals that insulin acts as a synchronizer for liver clock. *Scientific Reports*, 2(1), 1-10.
648. Pevet, P., and Challet, E. (2011). Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *Journal of Physiology-Paris*, 105(4-6), 170-182.
649. Tsutsui, K., Inoue, K., Miyabara, H., Suzuki, S., Ogura, Y., Tobari, Y., and Haraguchi, S. (2009). Discovery of a novel avian neurosteroid, 7 α -hydroxypregnenolone, and its role in the regulation of the diurnal rhythm of locomotor activity in Japanese quail. *General and Comparative Endocrinology*, 163(1-2), 117-122.
650. Yonei, Y., Hattori, A., Tsutsui, K., Okawa, M., and Ishizuka, B. (2010). Effects of melatonin: Basics studies and clinical applications. *Journal of Anti Aging Medicine*, 7, 85-91.
651. Manikonda, P. K., and Jagota, A. (2012). Melatonin administration differentially affects age-induced alterations in daily rhythms of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male rat liver. *Biogerontology*, 13(5), 511-524.





EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL (HADYEK) BAŞKANLIĞI

TOPLANTI TARİHİ	KARAR SAYISI	HAYBİS NO	BAŞVURU SAHİBİ
06.01.2022	2022/1-5	11966	Doç. Dr. Semra TÜRKÖĞLU

Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü	: Sıçan	Araştırmacılar
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soy	: <i>Wistar Albino</i>	
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti	: Erkek	
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı	: 43	
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı	: 6 Haftalık / 100 Gr.	

KARAR: "Fruktoz ile indüklenen alkolik olmayan karaciğer yağlanması olan sıçanlarda probiyotik desteğinin sirkadiyen saat üzerine etkisi" başlıklı çalışma kapsamında kullanılacak deney hayvanlarında yapılacak girişimlerde araştırmacılar tarafından "hayvan kullanım etiği ilkelerine" uyulacağı beyan edilmiştir. Bu çerçevede, söz konusu araştırmanın Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" hükümleri göz önüne alındığında çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna; oy birliği ile karar verildi.

BAŞKAN	Doç. Dr. Suat TEKİN
--------	---------------------

ÜYELER

Doç. Dr. Elif TAŞLIDERE Başkan Vekili	Prof. Dr. Şengül YÜKSEL Üye
Doç. Dr. Mustafa CANBOLAT Üye	Doç. Dr. Muharrem UÇAR Üye
Dr. Öğr. Üyesi Onural ÖZHAN Üye	Veteriner Hekim Engin KORKMAZ Üye
Avukat Mustafa Umut YALÇIN Sivil Üye	Öğretmen Kaan Akın ÖZ Sivil Üye

EK-2. Standart Yemin Diyet Örüntüsü

Besin Maddesi	Miktar	Besin Maddesi	Miktar
Ham Protein (%)	22,00	Nişasta (%)	29,09
Metabolik Enerji (gerçek) (kkal/kg)	2.700,00	3a672 A vitamini (IU)	12.000,00
Sodyum (%)	0,17	3a671 D3 vitamini (IU)	2.400,00
Kalsiyum (%)	1,12	3a700 E vitamini	20,00
Toplam Fosfor (%)	0,50	3a710 K3 vitamini	3,00
Ham yağ (%)	8,07	3a821 B1 vitamini	1,00
Ham posa (%)	3,64	3a825 B2 vitamini	6,00
Ham kül (%)	6,04	3a831 B6 vitamini	3,00
Lisin (%)	1,42	3a B12 vitamini	0,02
Metionin (%)	0,47	3a314 Niasin	30,00
Metionin+Sistein (%)	0,82	3a841 Pantotenik asit	8,00
Linoleik asit (%)	3,41	3a316 Folik asit	1,00
Toplam fosfor (%)	0,59	3a880 D-biotin	0,05
Potasyum (%)	0,96	3a890 Kolin	300,00
Klor (%)	0,16	3b502 Manganez (Mn)	100,25
Arjinin (%)	1,51	3b103 Demir (Fe)	25,25
Treonin (%)	0,84	3b603 Çinko (Zn)	59,50
Lösin (%)	1,62	3b405 Bakır (Cu)	5,00
Valin (%)	1,04	3b202 İyot (I)	0,62
Şeker (%)	4,47	3b801 Selenyum (Se)	0,20

EK-3. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

 T.C. Sağlık Bakanlığı	 Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu
GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	
DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI	
Sayın AYFER BEYAZ COŞKUN	
15.05.2018 - 23.05.2018 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi HADYEK tarafından Ankara İlinde düzenlenen “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.	
Prof. Dr. ABDULKADİR BEDİRLİ HADYEK BAŞKANI	Prof. Dr. İBRAHİM USLAN REKTÖR

EK-4. Turnitin Tez Benzerlik Raporu

ALKOLİK OLMAYAN KARACİĞER YAĞLANMASI OLAN SIÇANLARDA PROBİYOTİK DESTEĞİNİN SİRKADİYEN SAAT ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 2	% 2	% 1	% 0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	abs.firat.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	% 1
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1

Alıntıları çıkart üzerinde Eşleşmeleri çıkar < %1
Bibliyografyayı Çıkart üzerinde

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Beyaz Coşkun, Ayfer
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı	2017
Lisans	Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü	2011
Lise	Org. Bedrettin Demirel Lisesi	2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2019-devam ediyor	Fırat Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2015-2019	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2014-2015	Fırat Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2011-2014	Kamu Hastaneler Birliği Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi	Diyetisyen

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Beyaz Coşkun, A., Sağdıçoğlu Celep, A. G. (2021). Therapeutic modulation methods of gut microbiota and gut-liver axis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1-11.
2. Yurtdaş, G., Tek, N., Akbulut, G., Cemali, Ö., Arslan, N., Beyaz Coşkun, A., Zengin, F. H. (2020). Risk factors for constipations in adults: A cross-sectional study. *Journal of The American College of Nutrition*, 39(8), 713-719.
3. Özata Uyar, G., Beyaz Coşkun, A., Gökalp, G., Köksal, E. (2019). Association of mediterranean diet and anthropometric measures with quality of life in coronary artery disease patients. *Nutricion Hospitalaria*, 36(3), 674-680.

Diğer indeksler ve ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1. Beyaz Coşkun, A., Şanlıer, N. (2020). Guarana and its possible effects on health. *Journal of Gazi University Health Sciences Institute*, 2, 36-45.
2. Şanlıer, N., Adanur, E., Özata Uyar, G., Elibol, E., Beyaz Coşkun, A., Erdoğan, R., ve Bozbaş, E. (2017). Gençlerin beslenme ve gıda güvenliğine ilişkin bilgi ve davranışlarının değerlendirilmesi. *Kastamonu Eğitim Dergisi*, 25(3), 941-956.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve tam metni yayınlanan bildiriler

1. Beyaz Coşkun, A. (2020). Aging theories, anti-aging nutrition and diet recommendations. *4th International Health Sciences Conference (IHSC 2020)*, 348-359; Diyarbakır.
2. Beyaz Coşkun, A., Sağdıçoğlu Celep, A. G. (2020). Carotenoid-gene relationship and the role of carotenoids in prostate cancer. *4th International Health Sciences Conference (IHSC 2020)*, 341-347; Diyarbakır.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve özet metni yayınlanan bildiriler

1. Beyaz Coşkun, A., Sağdıçoğlu Celep, A. G. (2020). Effect of indole-3-carbinole on diseases caused by oxidative stress. *4th International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food*, 424, Xi'an, China.
2. Duyar Özer, Ş., Beyaz Coşkun, A., Gezmen Karadağ, M. (2020). Relationship between sarcopenia markers and vitamin D: A systematic review. *2nd World Conference on Sustainable Life Sciences*, 5, Kayseri.
3. Beyaz Coşkun, A., Bilici, S. (2020). The impact of education on attitude and national status: A cross-sectional study. *2nd World Conference on Sustainable Life Sciences*, 14, Kayseri.

4. Beyaz Coşkun, A., Sağdıçoğlu Celep, A. G. (2020). The place and importance of the gut-liver axis in liver diseases. *2nd World Conference on Sustainable Life Sciences*, 16, Kayseri.
5. Beyaz Coşkun, A., Bilici, S. (2017). Üniversite öğrencilerinde gelişen yeme bozukluğu: Sağlıklı beslenme takıntısı. *1. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi*, Aydın.
6. Beyaz Coşkun, A., Bilici, S. (2017). Üniversite öğrencilerinin beslenme bilgi durumlarının değerlendirilmesi. *1. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi*, Aydın.
7. Beyaz Coşkun, A., Özata Uyar, G., Gökalp, G. Köksal, E. (2017). Koroner arter hastalarında akdeniz diyetine uyum ve diyet yeterliliğinin değerlendirilmesi. *1. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi*, Aydın.
8. Özata Uyar, G., Beyaz Coşkun, A., Gökalp, G. Köksal, E. (2017). Koroner arter hastalarında akdeniz diyeti ve metabolik risk etmenlerinin değerlendirilmesi. *1. Uluslararası Sağlık Bilimleri Kongresi*, Aydın.
9. Şanlıer, N., Türközü, D., Elibol, E., Beyaz, A., Şahin, G., Yassıbaş, E. (2016). Effect of behaviours in different emotional states on obesity. *Obesity Facts*, 9(suppl 1), 137, Gothenburg/Sweden.
10. Beyaz, A., Elibol, E., Adanur, E., Özata, G., Erdoğan, R., Bozbaş, E., Şanlıer, N. (2016). Relation of food intake and body mass index in young students. *Obesity Facts*, 9(suppl 1), 138, Gothenburg/Sweden.
11. Şanlıer, N., Türközü, D., Beyaz, A., Elibol, E., Yassıbaş, E., Şahin, G. (2016). Waist to height ratio: Is it related with obesity and anthropometric measurements in Turkish individuals? *Obesity Facts*, 9(suppl 1), 143; Gothenburg/Sweden.
12. Akbulut, G., Beyaz, A. (2016). The evaluation of serum lipid profile after a weight loss program: A pilot study. *Obesity Facts*, 9(suppl 1), 203; Gothenburg/Sweden.
13. Akbulut, G., Beyaz, A. (2016). Evaluation of antropometric measurements and blood lipids of individuals who were applied diet with physical activity. *Obesity Facts*, 9(suppl 1), 203; Gothenburg/Sweden.
14. Yassıbaş, E., Şahin, G., Elibol, E., Beyaz, A., Duyar, Ş., Şanlıer, N. (2016). Correlation between dietary fat and antropometric measures on body fat composition in healthy individuals. *Obesity Facts*, 9(suppl 1), 233; Gothenburg/Sweden.
15. Şahin, G., Yassıbaş, E., Beyaz, A., Elibol, E., Duyar, Ş., Şanlıer, N. (2016). An evaluation of the relationship between handgrip strength, BMI and dietary components in healthy adults. *Obesity Facts*, 9(suppl 1), 234; Gothenburg/Sweden.
16. Beyaz, A., Akbulut, G. (2016). A recent approach to ghrelin level after bariatric surgery. *Obesity Facts*, 9(suppl 1), 244; Gothenburg/Sweden.
17. Beyaz, A., Şanlıer, N. (2016). Effects of beta glucans on blood glucose level. *The 3rd international conference on nutrition and growth*, Vienna / Austria.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

