



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**KARABAŞ OTU (*LAVANDULA STOECHAS L.*) ÖZÜTÜ
VE AKTİF BİLEŞENLERİNİN METABOLİK SENDROMA
KARŞI POTANSİYEL İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİ VE
HEDEF MEKANİZMALARININ
AYDINLATILMASI**

Seda KULABAŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

**KARABAŞ OTU (*LAVANDULA STOECHAS L.*) ÖZÜTÜ VE AKTİF
BİLEŞENLERİNİN METABOLİK SENDROMA KARŞI
POTANSİYEL İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİ VE HEDEF
MEKANİZMALARININ AYDINLATILMASI**

Seda KULABAŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 18/01/2018

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Tuğba TÜMER

ÇANAKKALE

Seda KULABAŞ tarafından Doç.Dr. Tuğba TÜMER yönetiminde hazırlanan ve 18/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Karabaş Otu (*Lavandula stoechas L.*) Özütü ve Aktif Bileşenlerinin Metabolik Sendroma Karşı Potansiyel İyileştirici Etkileri ve Hedef Mekanizmalarının Aydınlatılması**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof.Dr. Cüneyt AKI

Başkan

Doç.Dr. Tuğba TÜMER

Üye

Prof.Dr. Kemal Melik TAŞKIN

Üye

Doç.Dr. Zahide ÇAVDAR

Üye

Doç.Dr. Şevki ARSLAN

Üye

Prof.Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: (FDK-2017-1132). Bu çalışma TÜBİTAK Tarafından Desteklenmiştir. Proje Numarası: (112T442)

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Seda KULABAŞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren, ihtiyacım olduğu her an yardımlarını esirgemeyen, şu ana kadar pek çok nitelikli bilimsel araştırmada görev alma şansı veren, tez çalışmamın gerçekleşmesinde büyük emeği geçen saygı değer danışman hocam Doç.Dr. Tuğba TÜMER'e desteğinden ve emeğinden dolayı sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamın düzenleme ve değerlendirilmesinde emeği geçen tez izleme komitesi değerli jüri üyeleri Prof.Dr. Kemal Melik TAŞKIN ve Doç.Dr. Zahide ÇAVDAR'a; ayrıca, tez savunma sınavı değerli jüri üyeleri Prof.Dr. Cüneyt AKI ve Doç.Dr. Şevki ARSLAN'a katkılarından dolayı teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Tez çalışmamda kimyasal analizlerin gerçekleşmesinde büyük emeği geçen Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya bölümü öğretim üyesi Prof.Dr. İbrahim DEMİRTAŞ'a, Uzman Ali Rıza TÜFEKÇİ'ye ve Fatih GÜL'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamda transkriptom analizlerinin yorumlanmasında emeği geçen Pamukkale Üniversitesi Biyoloji bölümü öğretim üyesi Doç.Dr. Şevki ARSLAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamın deneysel aşamalarında benden yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Hande İPEK'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez dönemim süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen biricik eşim, hayat arkadaşım UĞUR KULABAŞ'a bana olan inancını hiç kaybetmediği için ve sonsuz desteği için teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Hayatımın her evresinde bana destek olan, bu zorlu süreçte de maddi ve manevi anlamda bana her zaman destek olan değerli ailem; sevgili annem Şükran SAVRANOĞLU, babam Zeki SAVRANOĞLU ve ağabeyim Ali SAVRANOĞLU'na teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunuyorum.

Tez dönemim süresince bana manevi destek veren sevgili arkadaşlarım Pelin CANLIGİL, Çiğdem YAKUT, Öznur KILIÇARSLAN, Erman KILIÇARSLAN, Hülya EREN'e teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunuyorum.

Tez çalışmasının tamamını finansal olarak 112T442 no'lu projeye destekleyen TUBİTAK'a teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca gen susturma çalışmalarını FDK-2017-1132 no'lu projeye kısmi olarak destekleyen ÇOMÜ BAP birimine teşekkür ediyorum.

Seda KULABAŞ
Çanakkale, Ocak 2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
SYA	Serbest yağ asidi
IR- β	İnsülin reseptör- β ta
PPAR- γ	Peroksizom proliferatör-aktive edilmiş reseptör
BCA	Bikinkoninik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
APS	Amonyum persülfat
EE	Etil asetat ekstratı
BE	n-bütanol ekstratı
FBS	Fetal sığır serum
8-CTP-cAMP	8-(4-klorofeniltiyo) adenozin 3',5'-siklik monofosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
BSA	Sığır serum albümin
MTT	3-(4, 5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difeniltetrazolium bromür
PEPCK	Fosfoenolpiruvat karboksikinaz
G6Paz	Glukoz-6-fosfataz
Nrf-2	Nuklear faktör 2
HO-1	Hem oksijenaz-1
NQO1	NAD(P)H quinon dehidrojenaz 1
AKT	Protein kinaz B
LPL	Lipoprotein lipaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAJE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PBS	Fosfat-tuz çözeltisi
TEMED	N', N', N'-tetrametil-etilen-diamin
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
İTK	İnce tabaka kromatografisi

ÖZET

KARABAŞ OTU (*LAVANDULA STOECHAS L.*) ÖZÜTÜ VE AKTİF BİLEŞENLERİNİN METABOLİK SENDROMA KARŞI POTANSİYEL İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİ VE HEDEF MEKANİZMALARININ AYDINLATILMASI

Seda KULABAŞ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman : Doç. Dr. Tuğba TÜMER

18/01/2018, 151

Metabolik sendrom (MetS) tüm dünyada geniş bir kitleyi etkileyen, insülin direnci, dislipidemi, abdominal obezite ve hipertansiyonun bir arada görülmesiyle tanımlanan multi-faktöriyel bir hastalıktır. Ancak, bu hastalığın tedavisinde kullanılabilecek etkin, multi-hedef bir farmakolojik ajan bulunmamaktadır. Bu nedenle, MetS patojenezindeki metabolik bozuklukları hedef alan bitkisel kökenli doğal geleneksel yaklaşımların araştırılması ve daha az yan etkiye sahip multi-hedef etken moleküllerin tespit edilmesi gerekmektedir.

Ülkemizde halk arasında MetS komponentlerinin tedavisinde *Lavandula stoechas* (Karabaş otu) bitkisinin sulu demlemesi alternatif amaçlı kullanılmaktadır. Ancak, bu bitkinin sulu özütünün içeriği ve biyoaktivitesi konusunda literatürde yeterli bilgi mevcut değildir. Tez çalışması kapsamında, Karabaş otu sulu özütü ve aktif bileşenlerinin MetS'ye karşı potansiyel iyileştirici etkileri ve hedef mekanizmalarının aydınlatılması planlanmıştır. Bu amaçla, 1) Karabaş otu sulu özütünün fitokimyasal bileşenleri ilk defa tanımlanmış, 2) MetS'ye karşı aktif ekstrat/fraksiyon/saf bileşikler *in vitro* hücre tabanlı/biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yöntemi kullanılarak tespit edilmiş, 3) Elde edilen aktif ekstrat/fraksiyon/saf bileşiklerin potansiyel iyileştirici mekanizmaları moleküler ve fizyolojik seviyede aydınlatılmıştır.

Sonuç olarak, EE (Etil Asetat Ekstrat)'nin, karaciğer hücre hattında glukoneojenez yolunu ve hız sınırlayıcı enzimleri etkin bir şekilde baskıladığı, ii) insülin direnci geliştirilen iskelet kası ve karaciğer hücrelerinde insülin hassasiyetini artırdığı

gösterilmiştir. Saflaştırılan bileşiklerden rosmarinik asit, kafeik asit, luteolin, propanoik asit metil ester, apigenin-7-glukozit ve kaffeoyl rosmarinik asitin MetS'ye karşı etkin bileşikler olduğu bulunmuştur. Kaffeoyl rosmarinik asitin tez çalışması kapsamında ilk defa, glukoneojenez, adipojeniz, insülin sinyalizasyonu ve inflamatuvar yollarda iyileştirici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, tez kapsamında insülin direnci geliştirilen karaciğer hücrelerinde yapılan tüm genom transkriptom analizi EE ile elde edilen biyoaktivite sonuçlarını destekleyici ve genişletici niteliktedir.

Anahtar sözcükler: *Lavandula stoechas*, Aktif Bileşen, Metabolik Sendrom, İnsülin Direnci, Moleküler Mekanizma



ABSTRACT

ELUCIDATION OF THE POTENTIAL AMELIORATIVE EFFECTS AND TARGET MECHANISMS OF *LAVANDULA STOECHAS L.* EXTRACT AND ITS ACTIVE COMPONENTS AGAINST METABOLIC SYNDROME

Seda KULABAŞ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

PhD Thesis In the Department of Biology

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Tuğba TÜMER

18/01/2018, 151

Metabolic syndrome (MetS) is a worldwide affecting, multifactorial disease characterized by insulin resistance, dyslipidemia, abdominal obesity and hypertension. There is no single multi-target agent for its treatment. It's necessary to investigate natural traditional approaches targeting MetS and associated morbidities to identify multi-target molecules with fewer side effects.

In our country, decoction or infusion of *Lavandula stoechas* is used traditionally for treatment of MetS. However, information related with the aqueous components and bioactivities of this plant are not sufficient. In current study, it's planned to investigate potential ameliorative effects of *Lavandula stoechas* extract and its active constituents against MetS and their mechanism of action. For this purpose, 1) the phytochemical components of the *L. stoechas* were described for the first time, 2) the active extract/fraction/pure compounds against MetS were determined by using *in vitro* cell-based/bioactivity guided fractionation method; 3) the molecular mechanisms of active extract/fraction/pure compounds have been elucidated.

As a result, it has been shown that EE (Ethyl Acetate Extract) efficiently suppressed gluconeogenesis pathway and rate limiting enzymes in hepatic cell lines, ii) increased insulin sensitivity in skeletal muscle and liver cells which are modelled for insulin resistance. Rosmarinic acid, caffeic acid, luteolin, propanoic acid methyl ester, apigenin-7-glucoside and caffeoyl rosmarinic acid are identified as active compounds against MetS. Caffeoyl rosmarinic acid was demonstrated for the first time to have ameliorative effect against insulin resistance and inflammation. Besides, results of transcriptomics analysis on

insulin resistant hepatic cells supported and extended the results of bioactivity studies obtained for EE.

Keywords: *Lavandula stoechas*, Active Component, Metabolic Syndrome, Insulin Resistance, Molecular Mechanism.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	iii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1. Tez çalışmasında Kullanılan Bitki Türü <i>Lavandula stoechas</i> (Karabaş otu).....	3
1.1.1. <i>Lavandula stoechas</i> Bitkisinin Sınıflandırılması.....	3
1.1.2. Lavandula Türlerinin Kullanımı.....	4
1.1.3. <i>Lavandula stoechas</i> Bitkisinin Tıbbi Kullanımı.....	4
1.1.4. <i>Lavandula stoechas</i> Bitkisinin İçeriğindeki Aktif Bileşenler	7
1.2. Dünya Çapında Bir Sorun “Metabolik Sendrom”	7
1.2.1. MetS Tanı Kriterleri	8
1.2.2. Metabolik Sendromun Global Prevalansı.....	10
1.2.3. Metabolik Sendrom Patojenezinde Rol Oynayan Metabolik Bozukluklar	12
1.2.3.1. Glukoz Homeostazı ve İnsülin Direnci.....	13
1.2.3.2. Aterojenik Dislipidemi	20
1.2.3.3. Viseral Obezite	22
1.2.3.4. Endotel Disfonksiyonu	23
1.2.3.5. Kronik İnflamasyon ve Oksidatif Stresin Metabolik Sendrom Patojenezindeki Önemi	25
1.3. Metabolik Sendroma Karşı Kullanılan Terapötik Yaklaşımlar	29
1.4. Metabolik Sendrom Tedavisinde Bitkisel Terapötiklerin Önemi	31
1.5 Çalışmanın Amacı	33
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	38
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1. Materyal	40
3.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar	40
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	41

3.1.3 Karabaş Otunun Temini ve Teşhisi	42
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları	42
3.2. Yöntem.....	42
3.2.1. Karabaş Otundan Farklı Çözücülerle Ekstratların Hazırlanması, Fraksiyonlanması, Saflaştırma ve İçerik Aydınlatma Analizleri	43
3.2.1.1. Ekstraksiyon İşlemleri	43
3.2.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) Analizi	44
3.2.1.3 HPLC-TOF/MS Analizi.....	45
3.2.1.4 GC-MS Analizi (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometri)	46
3.2.1.4.1. Sililleme Prosüdüğü.....	46
3.2.1.4.2. GC-MS Fırın Programı	47
3.2.1.5. EE'nin Kolon Kromatografisi ile Ayırıştırılması	47
3.2.1.6. Biyoaktif Fraksiyonların Flash Kromatografi ile Ayırıştırılması	48
3.2.1.7. Fraksiyonların İzolasyon Çalışmaları	49
3.2.1.7.1. E8 Fraksiyonunun İzolasyon Çalışması	50
3.2.1.7.2. E9 Fraksiyonunun İzolasyon Çalışması	50
3.2.1.7.3. E10 Fraksiyonunun İzolasyon Çalışması	51
3.2.1.7.4. E8, E9 ve E10 Fraksiyonlarının İçeriğindeki Moleküllerin Yapılarının Aydınlatılması	51
3.2.2. EE ve BE'nin Total Polifenol Miktarlarının Belirlenmesi	51
3.2.3. Hücre Büyütme ve Pasajlama Çalışmaları	52
3.2.4. C2C12 ve 3T3L1 Hücrelerinin Farklılaştırılması.....	52
3.2.5. Oil Red O Boyaması.....	53
3.2.6. Hücre Canlılığı Çalışmaları	53
3.2.7. Fizyolojik Etki Çalışmaları.....	54
3.2.7.1. Ekstratların, Fraksiyonların ve Saflaştırılan Bileşiklerin H4IIE Hücrelerinde Glukoneojenik Glukoz Üretimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	54
3.2.7.2. Ekstratların H4IIE Hücrelerinde Glukoz Tüketimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	55
3.2.7.3. Ekstratların İnsülin Direnci Geliştirilen C2C12 Miyotüplerinde Glukoz Alımı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	55
3.2.7.4. Saflaştırılan Aktif Maddelerin BTC-6 (fare pankreatik beta hücre hattı) Hücre Hattında İnsülin Salınımı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	56
3.2.7.5. Ekstratların ve Saflaştırılan Aktif Maddelerin 3T3L1 Adipositlerinde Gliserol Salınımı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi.....	57
3.2.8. Protein Ekspresyon Analizleri	57
3.2.8.1. Hücre Lizatlarında Total Protein Miktarının Tayini.....	57
3.2.8.2. C2C12 Fare İskelet Kası Hücrelerinde İnsülin Direnci Oluşturulması ve Western Blot Analizleri için Proteinlerin Toplanması	58

3.2.8.3. H4IIE Hepatoma Hücrelerinde İnsülin Direnci Oluşturulması ve Western Blot Analizleri için Proteinlerin Toplanması	58
3.2.8.4. Saflaştırılan Aktif Maddelerin BTC-6 (sıçan pankreatik beta) Hücrelerinde GLUT-2 Protein Seviyesi Üzerine Etkilerin Belirlenmesi	59
3.2.8.5. SDS-PAJE ve Western Blot Teknikleri	59
3.2.9. Gen Ekspresyon Analizleri	61
3.2.9.1. Ekstratların, Fraksiyonların ve Saflaştırılan Bileşiklerin H4IIE Hücrelerinde Glukoneojenezde Rol Oynayan Hedef Genlerin Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	61
3.2.9.2. Saflaştırılan Bileşiklerin BTC-6 Hücrelerinde Glukokinaz mRNA Seviyesi Üzerine Etkilerin Belirlenmesi	62
3.2.9.3. Saflaştırılan Bileşiklerle H4IIE Hücrelerindeki Transkriptom Analizleri için Kullanılan Yöntemler	63
3.2.9.4. RA-CA'nın RAW264.7 Makrofaj hücrelerinde Nrf-2 Aracılıklı Mekanizmasının Belirlenmesi	65
3.2.10. İstatiksel Analizler	65
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	67
4.1. Araştırma Bulguları	67
4.1.1. Biyoaktivite Rehberli Analizlerle Aktif Ekstratın Belirlenmesi	67
4.1.1.1. EE ve BE'nin Total Polifenol Miktarları	67
4.1.1.2. C2C12 ve 3T3L1 Hücrelerinin Farklılaştırılması	67
4.1.1.3. Hücre Canlılığı Sonuçları	69
4.1.1.4. Ekstratlar ile Gerçekleştirilen Fizyolojik Etki Çalışmaları	70
4.1.1.4.1. Ekstratların H4IIE Hücrelerinde Glukoz Tüketimi Üzerine Etkileri	70
4.1.1.4.2. Ekstratların İnsülin Direnci Geliştirilen C2C12 Miyotüplerinde Glukoz Alımı Üzerine Etkileri	71
4.1.1.4.3. Ekstratların H4IIE Hücrelerinde Glukoneojenik Glukoz Üretimi Üzerine Etkileri	72
4.1.1.4.4. Ekstratların 3T3L1 Hücrelerinde Gliserol Salınımı Üzerine Etkileri ...	73
4.1.1.5. Ekstratların Hedef Yolaklardaki Gen ve Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	74
4.1.1.5.1. Ekstratların H4IIE Hücrelerinde PEPCK ve G6Paz Gen Ekspresyonları Üzerine Etkileri	74
4.1.1.5.2. Ekstratların İnsülin Direnci Geliştirilen C2C12 Miyotüplerinde İnsülin Sinyalizasyonunda Rol Oynayan Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkileri	76
4.1.1.5.3. Ekstratların İnsülin Direnci Geliştirilen H4IIE Hücrelerinde İnsülin Sinyalizasyonunda Rol Oynayan Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkileri	82
4.1.2. Biyoaktivite Rehberli Çalışmalar ile Aktif EE Fraksiyonlarının Belirlenmesi ..	88
4.1.2.1. EE Fraksiyonlarının H4IIE Hepatoma Hücrelerinde Glukoneojenik Glukoz Üretimi Üzerine Etkileri	88

4.1.2.2. Fraksiyonların H4IIE Hücrelerinde Glukoneojenezde Rol Oynayan Hedef Genlerin Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkileri.....	89
4.1.2.3. Fraksiyonlarının İnsülin Direnci Geliştirilen C2C12 Hücrelerinde Hedef Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkileri.....	91
4.1.3. Aktif Olarak Belirlenen Fraksiyonlardan Etkin Moleküllerin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoaktivite Çalışmaları.....	94
4.1.3.1. Etkin moleküllerin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu.....	95
4.1.3.2. Saflaştırılan Bileşiklerin H4IIE Hepatoma Hücrelerinde Glukoneojenik Glukoz Üretimi Üzerine Etkileri.....	96
4.1.3.3. Saflaştırılan Bileşiklerin H4IIE Hepatoma Hücrelerinde PEPCK ve G6Paz enzimlerinin mRNA seviyesi Üzerine Etkileri.....	97
4.1.3.4. Saflaştırılan Bileşiklerin İnsülin Direnci Geliştirilen C2C12 Hücrelerinde Hedef Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkileri.....	100
4.1.3.5. Saflaştırılan Bileşiklerin İnsülin Direnci Geliştirilen H4IIE Hücrelerinde Hedef Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkileri.....	103
4.1.3.6. Saflaştırılan Bileşiklerin Pankreatik BTC-6 Hücrelerinde GLUT2 Protein Seviyesi Üzerine Etkileri.....	105
4.1.3.7. Saflaştırılan Bileşiklerin Pankreatik BTC-6 Hücrelerinde İnsülin Salınımı Üzerine Etkileri.....	106
4.1.3.8. Saflaştırılan Bileşiklerin Pankreatik BTC-6 Hücrelerinde Glukokinaz mRNA Seviyesi Üzerine Etkileri.....	107
4.1.3.9. Saflaştırılan Bileşiklerin 3T3L1 Hücrelerinde Gliserol Salınımı Üzerine Etkileri.....	108
4.1.3.10. Saflaştırılan Bileşiklerin H4IIE Hücrelerinde Transkriptom Üzerine Etkileri.....	108
4.1.3.11. İnflamasyon Modeli Geliştirilen RAW264.7 Makrofaj Hücrelerinde RA-CA Molekülünün Nrf-2 Aracılıklı Mekanizması.....	111
4.2. Tartışma.....	113
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	129
KAYNAKLAR.....	131
EKLERİ.....	I
EK 1. EE'nin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Profilinin Belirlenmesi, Flash Kromatografisi Kromotogramları.....	II
EK 2. EE aktif fraksiyonlarından saflaştırılan moleküllere ait NMR spektrumları.....	VII
EK 3. Tüm genom transkriptom analizlerinde çalışılan genler.....	XXIII
ÖZGEÇMİŞ.....	XXVI

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. <i>Lavandula stoechas</i> (Karabaş otu)	3
Şekil 1.2. <i>Lavandula stoechas</i> 'ın Avrupa'da ve Anadolu'daki farklı kullanımları.....	5
Şekil 1.3. <i>Lavandula stoechas</i> (Karabaş otu) bitkisinin ülkemizdeki ticari formları (sulu ekstre, kurutulmuş kapsül haline getirilmiş formları).....	6
Şekil 1.4. Metabolik sendromla ilişkili unsurlar.....	8
Şekil 1.5. NCEP-ATP III tanımına göre metabolik sendromun global prevalansı (Cameron ve ark., 2004)	11
Şekil 1.6. MetS prevalansının dünya çapında artışı (Vanita ve ark., 2011).....	12
Şekil 1.7. Metabolik sendromun patofizyolojisi (Huang, 2009'dan uyarlanmıştır)	13
Şekil 1.8. Pankreastan salınan insülin ve glukagon aracılığıyla plazma glukoz seviyesinin düzenlenmesi (Marieb ve Hoehn, 2013'den uyarlanmıştır)	15
Şekil 1.9. Glukozla uyarılan insülin salınımının mekanizması (Mancini ve Poitout, 2013'den uyarlanmıştır).....	16
Şekil 1.10. İskelet kasında insülin sinyalizasyonunun şematik diyagramı	17
Şekil 1.11. İskelet kasında yağ asidi ile indüklenen insülin direncinin moleküler mekanizması	19
Şekil 1.12. Karaciğerde yağ asidi ile indüklenen insülin direncinin moleküler mekanizması	20
Şekil 1.13. Aterojenik dislipideminin gelişimi (Huang, 2009'dan uyarlanmıştır)	22
Şekil 1.14. Endotel disfonksiyonunun gelişimi (Huang, 2009'dan uyarlanmıştır)	24
Şekil 1.15. Adipoz doku genişlemesinin immün sistem elemanları ve insülin direncine etkileri	26
Şekil 1.16. Makrofajlarda Nrf-2 ve NF-kB arasındaki koruyucu mekanizma, (Wakabayashi ve ark., 2010)	29
Şekil 1.17. Karabaş otu sulu özütünün içeriğindeki aktif bileşenlerin biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yöntemiyle tanımlanması	34
Şekil 3.1. a) Neo-clavenger aparatı yardımıyla Karabaş otunun sulu demlemesi, b) Çözücü ile ekstraksiyon işlemi.....	44
Şekil 3.2. EE'nin ince tabaka kromatografisi görüntüleri	44
Şekil 3.3. EE' nin HPLC-TOF/MS analizi öncesi hazırlanma aşamaları.....	45
Şekil 3.4. EE'nin Sephadex LH-20 kolon dolgu maddesine uygulanması	47
Şekil 3.5. a) EE Fraksiyonlarının ayrıştırılması için kullanılan flash kromatografisi, b) Flash kromatografisi kolonları (kartuşları), c) EE	48
Şekil 3.6. Spesifik antikorlar kullanılarak proteinlerin immünolojik analizi (https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresis.htm den uyarlanmıştır)	60
Şekil 4.1. Karabaş otu sulu demlemesinden elde edilen EE ve BE'nin total polifenol miktarları.....	67
Şekil 4.2. C2C12 miyoblastlarının farklılaşarak miyotüplere dönüşümü.....	68
Şekil 4.3. 3T3L1 fare preadiposit hücrelerinin farklılaşarak adipositlere dönüşümü.....	68
Şekil 4.4. Adipositlere farklılaşan 3T3L1 hücrelerinde lipit birikiminin Oil red O boyama ile doğrulanması.....	69
Şekil 4.5. Karabaş otundan elde edilen EE'nin H4IIE, C2C12 ve 3T3L1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri	69
Şekil 4.6. Karabaş otundan elde edilen BE'nin H4IIE, C2C12 ve 3T3L1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri	70
Şekil 4.7. EE ve BE'nin H4IIE hücrelerinde glukoz tüketimi üzerine etkileri. *Kontrol	

grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05).....	71
Şekil 4.8. EE ve BE'nin serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 miyotüplerindeki glukoz alımı üzerine etkileri. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	72
Şekil 4.9. EE ve BE'nin H4IIE hücrelerinde glukoneojenik glukoz üretimi üzerine etkileri. *(+) Dex-cAMP kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	73
Şekil 4.10. EE ve BE'nin 3T3L1 hücrelerinde gliserol salınımı üzerine etkileri. *İndüklenmiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	74
Şekil 4.11. EE ve BE'nin H4IIE hücrelerinde PEPCK gen ekspresyon seviyesine etkileri. *(+) Dex-cAMP kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	75
Şekil 4.12. EE ve BE'nin H4IIE hücrelerinde G6Paz gen ekspresyon seviyesine etkileri. *(+) Dex-cAMP kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	76
Şekil 4.13. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki p-AKTSer473/AKT proteinlerinin seviyeleri üzerine etkileri. (B) p-AKTSer473/AKT protein seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05).....	77
Şekil 4.14. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki GLUT-4 proteinlerinin seviyeleri üzerine etkileri. (B) GLUT-4 protein seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	78
Şekil 4.15. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki IR-β protein seviyesi üzerine etkileri. (B) IR-β protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	79
Şekil 4.16. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki p-IRS-1 Ser 307 protein seviyesi üzerine etkileri. (B) p-IRS-1Ser307 protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	80
Şekil 4.17. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki LPL protein seviyesi üzerine etkileri. (B) LPL protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	81
Şekil 4.18. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki PPAR-γ protein seviyesi üzerine etkileri. (B) PPAR-γ protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	82
Şekil 4.19. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hepatoma hücrelerindeki p-AKTSer473/AKT oranı üzerine etkileri. (B) p-	

	AKTSer473/AKT seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)	83
Şekil 4.20.	EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hepatoma hücrelerindeki IR- β protein seviyesi üzerine etkileri. (B) IR- β protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$).....	84
Şekil 4.21.	EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hepatoma hücrelerindeki GLUT-2 protein seviyesi üzerine etkileri. (B) GLUT- 2 protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)	85
Şekil 4.22.	EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hücrelerindeki LPL protein seviyesi üzerine etkileri. (B) LPL protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$).....	86
Şekil 4.23.	EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hepatoma hücrelerindeki PPAR- γ protein seviyesi üzerine etkileri. (B) PPAR- γ protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)	87
Şekil 4.24.	E1-E12 fraksiyonlarının 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozunun H4IIE hücrelerinde glukoneojenik glukoz üretimi üzerine etkileri. *(+) Dex-cAMP kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$). .89	89
Şekil 4.25.	E1-E12 fraksiyonlarının H4IIE hücrelerinde PEPCK gen ekspresyon seviyesine etkileri. *(+) Dex-cAMP indüklenmiş kontrol ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)	90
Şekil 4.26.	E1-E12 fraksiyonlarının H4IIE hücrelerinde G6Paz gen ekspresyon seviyesine etkileri. * (+) Dex-cAMP indüklenmiş kontrol ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)	91
Şekil 4.27.	E1-E12 fraksiyonlarının 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki p-AKTSer473/AKT proteinlerinin seviyesi üzerine etkileri, (B) p-AKTSer473/AKT proteinlerinin seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması.* (+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$).....	92
Şekil 4.28.	E1-E12 fraksiyonlarının 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki LPL protein seviyesi üzerine etkileri. (B) LPL protein seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)	93
Şekil 4.29.	Aktif fraksiyonların (E8, E9 ve E10) HPLC-TOF kromatogramları ve negatif iyon kütleleri	95
Şekil 4.30.	E8, E9, ve E10 fraksiyonundan izole edilen bileşiklerin yapıları	96
Şekil 4.31.	Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının H4IIE hücrelerinde glukoneojenik glukoz üretimi üzerine etkileri. * (+) Dex-c-AMP kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$). .97	97
Şekil 4.32.	Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının H4IIE hücrelerinde PEPCK gen	

- ekspresyon seviyesine etkileri. *(+) Dex-cAMP indüklenmiş kontrol ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$). 98
- Şekil 4.33. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının H4IIE hücrelerinde G6Paz gen ekspresyon seviyesine etkileri. *(+) Dex-cAMP indüklenmiş kontrol ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$). 99
- Şekil 4.34. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki p-AKTSer473/AKT proteinlerinin seviyesi üzerine etkileri. (B) p-AKTSer473/AKT proteinlerinin seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)..... 101
- Şekil 4.35. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki IR- β protein seviyesi üzerine etkileri. (B) IR- β protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. * (+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$) 102
- Şekil 4.36. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki PPAR- γ protein seviyesi üzerine etkileri. (B) PPAR- γ protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. * (+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)..... 103
- Şekil 4.37. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hücrelerindeki p-AKTSer473/AKT proteinlerinin seviyesi üzerine etkileri. (B) p-AKTSer473/AKT oranının densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. * (+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)..... 104
- Şekil 4.38. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hücrelerindeki LPL protein seviyesi üzerine etkileri. (B) LPL protein seviyesi densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$) 105
- Şekil 4.39. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının (A) BTC-6 pankreatik beta hücrelerinde hücrelerindeki GLUT-2 protein seviyesi üzerine etkileri. (b) GLUT-2 protein seviyesi densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)..... 106
- Şekil 4.40. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının BTC-6 pankreatik beta hücrelerinde insülin salınımı üzerine etkileri. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)..... 107
- Şekil 4.41. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının BTC-6 pankreatik beta hücrelerinde Glukokinaz mRNA seviyesi üzerine etkileri. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$) 107
- Şekil 4.42. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının 3T3L1 hücrelerinde gliserol salınımı üzerine etkileri. * İsopterenol (+) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)..... 108
- Şekil 4.43. Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde RA-CA' nın Nrf-2 mRNA seviyesi üzerine etkileri. * Kontrol siRNA (+) LPS kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$) 111

Şekil 4.44. Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde RA-CA' nın HO-1 mRNA seviyesi üzerine etkileri. * Kontrol siRNA (+) LPS kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	112
Şekil 4.45. Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde RA-CA' nın NQO1 mRNA seviyesi üzerine etkileri. * Kontrol siRNA (+) LPS kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	112
Şekil 4.46. Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde RA-CA' nın iNOS mRNA seviyesi üzerine etkileri. * Kontrol siRNA (+) LPS kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)	113
Şekil 4.47. Metabolik sendromla ilişkili metabolik bozukluklar.....	114
Şekil 4.48. SYA uygulanan hepatik hücrelerde TNF ve PI3K-Akt sinyal yolları için KEGG yolak analizi. + f fosforilasyonu, -p defosforilasyonunu ifade etmektedir	127
Şekil 5.1. <i>Lavandula stoechas</i> bitkisinin multihedef aktivitesi	130
EK Şekil 1.1. EE'nin HPLC-TOF kromatogramı.....	II
EK Şekil 1.2. EE'nin HPLC-TOF/MS Analiz Sonuçları.....	II
EK Şekil 1.3. A) Flash Kromatografisi 1. Program'da elde edilen kromatogramlar ve benzer fraksiyonlar, B) Flash Kromatografisi 2. Program'da elde edilen kromatogramlar ve benzer fraksiyonlar	VI
EK Şekil 2.1. E8 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E8-1 bileşiğine ait a) ¹ H (Proton), b) (Karbon), c) HMBC, d) HSQC, e) COSY, f) DEPT NMR analizi sonuçları	IX
EK Şekil 2.2. E8 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E8-2 bileşiğine ait a) ¹ H (Proton), b) (Karbon), c) HMBC, d) HSQC, e) COSY, f) DEPT NMR analizi sonuçları	XI
EK Şekil 2.3. E8 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E8-3 bileşiğine ait a) ¹ H (Proton), b) (Karbon), c) HMBC, d) HSQC, e) COSY, f) DEPT NMR analizi sonuçları	XIII
EK Şekil 2.4. E8 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E8-4 bileşiğine ait a) ¹ H (Proton), b) (Karbon), c) HMBC, d) HSQC, e) COSY, f) DEPT NMR analizi sonuçları	XVI
EK Şekil 2.5. E9 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E9-2 bileşiğine ait a) ¹ H (Proton), b)(Karbon), c)HMBC, d)HSQC, e)COSY, f)DEPT NMR analizi sonuçları	XVIII
EK Şekil 2.6. E10 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E10-1 bileşiğine ait ¹ H (Proton), (Karbon), HMBC, HSQC, COSY, DEPT NMR analizi sonuçları	XX
EK Şekil 2.7. E10 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E10-2 bileşiğine ait a) ¹ H (Proton), b)(Karbon), c)HMBC, d)HSQC, e)COSY, f)DEPT NMR analizi sonuçları	XXIII

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. <i>Lavandula stoechas</i> bitkisinin bilimsel sınıflandırılması	4
Çizelge 1.2. Metabolik sendrom tanı kriterleri	10
Çizelge 3.1. HPLC mobil faz programı	46
Çizelge 3.2. Flash Kromatografisi fraksiyon aralığı ve çözücü sistemleri	49
Çizelge 3.3. İnsülin direnci oluşturulmasında gruplara özgü kullanılan uygulama besiyerlerinin bileşimi ve oranları	56
Çizelge 3.4. SDS-PAJE yönteminde kullanılan ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel bileşenleri	60
Çizelge 4.1. EE fraksiyonlarının adlandırılması	88
Çizelge 4.2. EE'den elde edilen (E1-E12) fraksiyonların 5 ayrı parametre ile taranması sonucunda ortaya çıkan % değişim tablosu	94
Çizelge 4.3. Saflaştırılan bileşiklerin tarama sonuçları	100
Çizelge 4.4. Örneklerde değişim gösteren prob sayıları	109
EK Çizelge 1.1. EE'nin GC-MS Analizi Sonuçları	II
EK Çizelge 3.1. SYA uygulaması yapılan H4IIE hücre dizisinde farklı olarak ifade edilen genlerin listesi	XXIII

BÖLÜM 1

GİRİŞ

İlk defa 1988 yılında tanımlanan ve “ölümcül dörtlü” olarak da adlandırılan metabolik sendrom (MetS); insülin direnci, hiperlipidemi, obezite ve hipertansiyonun bir arada görüldüğü multi-faktöriyel bir hastalıktır. Tüm bu metabolik bozuklukların birlikte gelişerek tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar için büyük oranda risk oluşturması, MetS'nin mortalite ve morbiditeye neden olan büyük bir halk sağlığı problemi olduğunu açıkça göstermektedir. Günümüzde hazır gıda tüketiminin artması, yüksek kalorili besinlerin tüketilmesi, fiziksel aktivitenin azalması bu hastalığın gelişimine büyük oranda zemin hazırlayan faktörlerdir. Tüm dünya nüfusunun % 25' ini etkileyen bu hastalığın, ülkemizde görülme sıklığı erkekler arasında % 28 iken, bayanlar arasında bu oran % 40 gibi neredeyse nüfusun yarısını etkileyen yüksek değerlerdedir (Kozan ve ark., 2007). Bu nedenle metabolik sendroma karşı koruyucu önlemlerin alınması ve yeni tedavi stratejilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir.

MetS bileşenlerinin, nedenlerinin ve sonuçlarının iç içe geçtiği, birden fazla hedefe yönelik yaklaşımlarla tedavi edilebilen multifaktöriyel bir hastalıktır. 21. yüzyılın sağlık sektörüne getirdiği pek çok yeniliğe rağmen, günümüzde, MetS için koruyucu ve tedavisinde kullanılacak multi-hedef, güvenli ve etkili bir farmakolojik ajan bulunmamaktadır. İlaç sektörü her ne kadar 1950'li yıllardan itibaren yüzünü sentetik “smart” olarak adlandırılan tek-hedef moleküllere döndüyse de; 2000'li yıllarda insidansı artan multi-faktöriyel hastalıkların tedavisi için gerekli multi-hedef moleküllerin en etkin kaynağının doğada bulunan moleküller olduğunu kabul etmiştir. Son yıllarda, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), halk arasında MetS bileşenlerine karşı tedavi amaçlı kullanılan bitkilerden deneysel olarak ekstre kütüphanelerinin (botanical extract library) oluşturulması ve bu ekstrelerden biyoaktif multi-hedef moleküllerin taranmasına yönelik çalışmaları teşvik etmekte ve ulusal boyutta büyük fonlarla desteklemektedir. Özellikle ABD'de bu amaçla kurulmuş ve NIH tarafından desteklenen çok sayıda araştırma merkezi (Botanical Research Center for Metabolic Syndrome) bulunmaktadır. 1981-2001 yılları arasında ABD tarafından onaylanan ilaçların % 70' inin doğal moleküller üzerine yapılmış çalışmaların sonucunda piyasaya çıktığı düşünüldüğünde, yapılan bu çalışmaların, ilerleyen dönemlerde metabolik sendromun önlenmesinde ve tedavisinde umut vaat edici sonuçlar doğuracağı beklenmektedir. Bu çalışmalarda, genellikle Çin geleneksel tedavilerinde kullanılan

bitkiler, Aborjinlerin, Güney Amerika ve Orta Asya (Kazakistan, Kırgızistan, Özbekistan ve Tajikistan) halklarının kullandığı şifalı bitkiler taranmaktadır.

Ülkemizde, kökleri milattan önceye (M.Ö 2500) kadar dayanan oldukça çeşitli ve geniş bir şifalı bitkiler kültürü bulunmaktadır. Tüm dünyada, özellikle ABD’de şifalı bitkilere ait ekstre kütüphanelerinin oluşturulması ve bu ekstrelerden aktif madde taramasına yönelik ortaya konulan çabalara rağmen, sahip olduğumuz şifalı bitkiler kültürü yeni etken moleküllerin keşfi için aktif olarak kullanılmamaktadır. Bu nedenle, tez çalışması kapsamında, MetS tedavisinde aday olabilecek aktif bitki ekstratı, fraksiyonları ve aktif fitokimyasalların ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, tez çalışması kapsamında çalışılan bitki türü, Çanakkale ve yakın çevresinde (Bayramiç, Ayvalık, Kazdağları, Bandırma, Balıkesir ve Edremit) gerçekleştirilen etnobotanik çalışmalarda ele alınan bitkiler tek tek taranarak belirlenmiştir. Halk arasında şeker hastalığı, yüksek tansiyon, kalp ve damar hastalıklarının tümünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan *Lavandula stoechas* bitkisi-“Karabaş otu” MetS’nin tüm komponentlerini hedef alan bir bitki türü olarak seçilmiştir. MetS gelişiminin başlangıcında insülin direncinin önüne geçilebilirse, diğer bir deyişle insülin direnci gelişiminin altında yatan mekanizmalarda etkin önleyici bir ajan ortaya çıkarılırsa, art arda gelen bu hastalıkların da gelişimi engellenebilir. Bu aktif maddelerin ya da fraksiyonların, insülin direncini önleyici etkilerinin ortaya çıkarılması ve bunların ilaç ham maddesi ya da diyetel takviye olarak kullanım potansiyelleri, sağlık sektöründe var olan birçok firma açısından ticari önem taşımaktadır. Özellikle, tek bir aktif maddenin yanısıra, fraksiyon içerisinde yer alan birçok maddenin sinerjistik etkisinin değerlendirilmesiyle elde edilen veriler, ileri safhalarda klinik araştırmalarla desteklenerek bu maddelerin/fraksiyonların ticarileştirilmesini ve etkin diyetel takviye ürünlerinin piyasaya sürülerek ‘alternatif ve tamamlayıcı tedavi’ amaçlı kullanımını mümkün kılabilir.

1.1. Tez çalışmasında Kullanılan Bitki Türü *Lavandula stoechas* (Karabaş otu)

Lavandula stoechas, uzun yıllardır Anadolu halk hekimliğinde kullanılan Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait ve doğal olarak yetişen aromatik bir bitkidir (Ayrıl, 1997; Öztürk ve ark., 2005). Halk arasındaki yaygın ismiyle Karabaş otu olarak bilinen *Lavandula stoechas*, ülkemizde özellikle Çanakkale, İstanbul, Balıkesir, İzmir, İzmit, Muğla, Datça, Antalya, Tekirova, Hatay bölgelerinde yetişmektedir (Ayrıl, 1997; Sarıkan, 2007; Yenici, 1999). Doğal olarak yetişebilen bu bitki türü daha çok kuru bölgelerde, ormanlarda, kireç taşı ve granitli, asit oranı yüksek olmayan topraklarda yayılış göstermektedir. Lamiaceae familyasının *Lavandula* cinsine ait bu tür, 45-50 cm yüksekliğinde, dalların ucunda silindirik yapıda, Şekil 1.1’ de görüldüğü gibi siyahımsı mor rengi çiçekleri olan çalı görünümünde soğuğa toleransı olan çok yıllık bir bitkidir. Çiçekleri 1,5–4,5 cm uzunluğundadır, baklava dilimi şeklinde çiçekli braktelere, sivri ucun üzerinde uzun ve parlak lavanta mavisi renklerde 4-8 mm uzunluğunda çiçeklere sahiptir (Şekil 1.1). Mayıs, Haziran, Temmuz ayları bu bitkinin çiçeklenme zamanlarıdır (Onar, 2006; Yenici, 1999).



Şekil 1.1. *Lavandula stoechas* (Karabaş otu)

1.1.1. *Lavandula stoechas* Bitkisinin Sınıflandırılması

Lamiales takımından Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait *Lavandula* cinsi, çalimsı görünüşlü, çok yıllık 28 bitki türünün ortak adıdır (Çizelge 1.1). *Lavandula stoechas* türüne ait bilimsel sınıflandırma Çizelge 1.1’ de verilmiştir.

Çizelge 1.1. *Lavandula stoechas* bitkisinin bilimsel sınıflandırılması

Alem	Plantae (Bitkiler)
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf	Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım	Lamiales
Familya	Lamiaceae (Ballıbabagiller)
Cins	Lavandula
Tür	<i>Lavandula stoechas</i>
Binominal ad	<i>Lavandula stoechas</i> L.

1.1.2. *Lavandula* Türlerinin Kullanımı

Lavandula cinslerinden *Lavandula stoechas* (Tepesinde Lavanta), *Lavandula angustifolia* (İngiliz lavantası), *Lavandula latifolia* (Portekiz Lavantası) ve *Lavandula dentata* (Fransız lavantası) türleri yaygın şekilde tıbbi amaçlı kullanılmaktadır (Chu ve Kemper, 2001) Özellikle flavonoidler, terpenik bileşikler ve fenolik asitler bakımından zengin olan bu türler önemli fizyolojik etkilere sahiptir. Literatürde lavanta türlerinden elde edilen uçucu yağ bileşenlerinin, analjezik, antispazmotik, anjiyoprotektan, neuropsikiyatrik, antikonvulsan, antiviral, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antifungal, antineoplastik, antioksidan özelliklerinin gösterildiği birçok çalışma bulunmaktadır (Cavanagh ve Wilkinson, 2002). Lavanta türlerinin yağı tüm dünyada özellikle aromaterapide, parfümeri ve kozmetik sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, *Lavandula* türlerinin içeriğinde bulunan öjenol, rosmarinik asit, α -terpineol, terpinen-4-ol ve kafurun antibakteriyal özellikte olduğu, yüksek oranda bulunan kafurun böceksavar özelliğinden dolayı insektisit olarak da kullanıldığı bilinmektedir (Pattnaik ve ark., 1997; Chu ve Kemper, 2001). Bunun dışında bütün *Lavandula* türlerinde bulunan sineol, antispazmodik ve lokal anestezi aktivite göstermektedir (Pattanaik ve ark., 1997).

1.1.3. *Lavandula stoechas* Bitkisinin Tıbbi Kullanımı

Lavandula stoechas bitkisi uçucu yağlar, aromatik yağlar ve benzeri sekonder metabolitler bakımından zengin olması nedeniyle; gıda, eczacılık, tıp, kozmetik ve parfümeri gibi alanlarda büyük öneme sahiptir. Sahip olduğu esansiyel yağ bileşenleri nedeniyle Avrupa'da ve Türkiye'de de bahsedilen sektörlerde yaygın kullanım potansiyeline sahip bir lavanta türüdür. Buna ek olarak, ülkemizde Karabaş otunun toprak üstü kısımlarından elde edilen infüzyonu ve dekoksasyonu terapötik amaçlı olarak yaygın

şekilde kullanılmaktadır (Şekil 1.2). Bu bitki Anadolu'nun değişik bölgelerinde, uzun yıllardır yöre insanları tarafından sulu demlemesi yapılarak, kalp hastalıklarının tedavisinde; damar açıcı, kolestrol düşürücü, kan şekeri düşürücü, ağrı kesici, antiseptik, balgam söktürücü, idrar yolları iltihap giderici, egzama yaralarını iyileştirici, sinir sistemini yatıştırıcı, gaz söktürücü, kalp kuvvetlendirici, sigara içme isteğini engelleyici, bağışıklık sistemi kuvvetlendirici gibi farklı etkileri nedeniyle tüketilmektedir (Baytop, 1999; Yenici, 1999; Sarıkan, 2007; Bulut, 2006).



Şekil 1.2. *Lavandula stoechas*'ın Avrupa'da ve Anadolu'daki farklı kullanımları

Karabaş otunun MetS'nin tüm komponentlerinin (hiperglisemi, dislipidemi, tansiyon ve obezite) tedavisinde başarılı olacağını düşündüren pek çok etnobotanik çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda; 1) toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyonun dahilen, kolesterolu ve kan şekerini düşürmede ve kalp hastalıklarının tedavisinde (Bulut, 2006), 2) Kurutulmuş toprak üstü kısımlarının demlenmesi veya kaynatılması ile elde edilen çayının kalp damarlarını açmak, zayıflamak, tansiyon ve kolesterolu düşürmek amacıyla, ayrıca göğüs kanserinde (Onar, 2006), 3) Karabaş otunun toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyonun özellikle şeker hastalığında, kalp ve damar hastalıklarında damar açıcı ve kolesterol düşürücü olarak (Sarıkan, 2007) kullanıldığı

bildirilmiştir. Ülkemizin güney batısında yapılan etnobotanik araştırmalarda ise, Karabaş otunun toprak üstü kısımlarından hazırlanan infüzyonun diyabet tedavisinde, kalp ve damar hastalıklarının tedavisinde, ayrıca kolesterol düşürücü olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Ertuğ, 2002; Tuzlacı, 2002). Tüm bu çalışmalara ek olarak, Karabaş otunun alkol ve sulu ekstralarının, *in vitro* olarak fibrinolitik sistemi (kan pıhtısı içindeki fibrinin çözülmesi) aktive ettiği bulunmuştur (Yenici, 1999). Dünya literatürüne baktığımızda Karabaş otu türünün dünyanın bazı bölgelerinde de (İtalya, Tunus, Fas) halk arasında antihiperglisemik ve antihipertansif olarak kullanıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Tahraoui ve ark., 2007; Leporatti ve ark., 2009). Ancak bu etkileri gösteren laboratuvar çalışmaları son derece kısıtlıdır. Örneğin, Scirus veri tabanında Karabaş otu ve antihiperglisemik etkisini araştıran ilgili yalnızca bir makale bulunmuştur. Bu makalede hiperglisemik sıçanlara Karabaş otu infüzyonunun uygulanmasından sonraki 30. ve 90. dakikalarda serum glukoz seviyesinin normal seviyelere düştüğü gözlemlenmiştir (Gamez ve ark., 1987). Aynı şekilde yapılan taramada bu bitkinin tansiyon düşürücü etkisini gösteren sadece bir çalışma bulunmaktadır. Bunda da hipertansif sıçanlarda Karabaş otu ekstresinin kan basıncını normal seviyeye düşürdüğü gösterilmiştir (Tabassum ve Ahmad, 2011). Şekil 1.3’de görüldüğü gibi ülkemizde Karabaş otunun bazı ticari formları damar açıcı, tansiyon ve kan şekerini düşürücü olarak pazarlanmaktadır.



Şekil 1.3. *Lavandula stoechas* (Karabaş otu) bitkisinin ülkemizdeki ticari formları (sulu ekstre, kurutulmuş kapsül haline getirilmiş formları)

Ülkemizde gerçekleştirilen etnobotanik çalışmalarda, Karabaş otunun toprak üstü kısımlarının suda dekoksasyon (demleme) ya da kaynatma yöntemleri kullanılarak hazırlandığı belirtilmektedir. Bu nedenle Karabaş otunun MetS'nin ölümcül dörtlü olarak betimlenen tüm komponentlerini tedavi etmeye yönelik antihiperglisemik, damar açıcı, antihipertansif, kolesterol düşürücü etkilerinden sulu özütünde bulunan fitokimyasalların

sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Bu hipotezden yola çıkarak, tez çalışmasında, Karabaş otundan hazırlanan sulu özüt farklı iki çözücü sistemi kullanılarak ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş ve daha sonra *in vitro* hücre tabanlı biyoaktivite rehberli fraksiyonlama tekniği kullanılarak bitkinin insülin direnci temelinde gelişen patofizyolojik durumlara karşı etkin bileşenleri ve bunların moleküler mekanizmaları aydınlatılmıştır.

1.1.4. *Lavandula stoechas* Bitkisinin İçeriğindeki Aktif Bileşenler

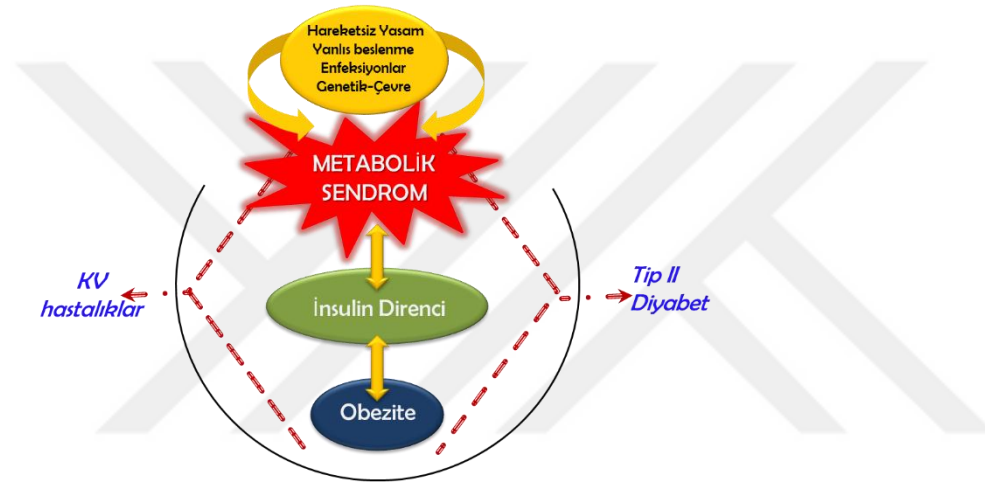
Literatürde *Lavandula* türlerinin uçucu yağ bileşenlerini ortaya koyan pek çok araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda *Lavandula* türlerinin esansiyel yağının ana bileşenlerinin monoterpenlerin türevleri (linalol, linalyl asetat, 1-8-sineol, β -ocimine, fenchone, kafur), benzenoidler (kumarin, rosmarinik asit) ve seskiterpenler olduğu gösterilmiştir (Baytop; 1999; Orhan, 2007). Bu bileşiklerin relatif konsantrasyonları, farklı *lavandula* türlerinde değişiklik gösterebilmektedir. Terapötik öneme sahip dört Lavanta türünden *L. latifolia* ve *L. stoechas* esansiyel yağları yüksek kafur seviyesine sahipken, *L. dentata* ve *L. angustifolia* türlerinde bu oranın daha düşük olduğu bilinmektedir (Cavanagh ve Wilkinson, 2002). Ayrıca, esansiyel yağ içerisinde bulunan eugenol, rosmarinik asit, alfa-terpeneol, terpenen-4-ol ve kafur bileşiklerinin de lavanta yağının antibakteriyel etkisini, Sineol bileşenin de antispazmodik ve lokal anestetik etkisini ortaya koymada etkili olduğu bilinmektedir (Pattnaik ve ark., 1997; Chu ve Kemper, 2001).

İtalya, Yunanistan, Korsika, Tunus ve Fas bölgelerinde *Lavandula stoechas* türü ile yapılan çalışmalarda, bu türden elde edilen uçucu yağın temel bileşenlerin bisiklik monoterpenler (fenkon, kafur ve 1,8-sineol) olduğu rapor edilmiştir (Skoula ve ark., 1996; Messaoud ve ark., 2012). Ancak, Türkiye'deki *L. stoechas* bitkisinin uçucu yağ bileşimine bakıldığında, adı geçen bölgelerdeki yağ bileşenlerinden farklı olarak, pulegon (% 40,4), mentol (% 18,1) ve menton (% 12,1) bileşenlerinin baskın olduğu bildirilmiştir (Gören ve ark., 2002).

1.2. Dünya Çapında Bir Sorun “Metabolik Sendrom”

21. yüzyılın yoğun endüstrileşme ve kentselleşme sürecinde değişen yaşam tarzı ile birlikte metabolik sendrom (MetS) olarak adlandırılan yeni bir hastalık gündeme gelmiştir. İlk defa 1988 yılında Reaven tarafından bileşenleri ayrıntılı bir şekilde ortaya konulan bu kavram, glukoz metabolizmasındaki bozukluklar (insülin direnci, hiperglisemi, glukoz intoleransı), dislipidemi, abdominal obezite ve hipertansiyonun bir arada görüldüğü multi-faktöriyel bir hastalıktır (Miranda ve ark., 2005; Alberti ve ark., 2006). Tüm bu metabolik

bozuklukların birlikte gelişerek tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar için büyük oranda risk oluşturmaları, MetS'nin mortalite ve morbiditeye neden olan büyük bir halk sağlığı problemi olduğunu açıkça göstermektedir (Haffner ve ark., 1992; Isomaa ve ark., 2001). Hastalık ayrıca polikistik over sendromu, karaciğer yağlanması, astım ve bazı kanser çeşitleri için de yüksek oranda risk faktörü oluşturmaktadır (Cefalu ve ark., 2008). 1998 yılı itibariyle Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tanı kriterleri konulan ve klinik pratiğe giren MetS, ilerleyen süreçte tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi ölüm riski yüksek metabolik bozukluklara sebebiyet verdiğinden “Deadly quartet” ölümcül dördü olarak da ifade edilmektedir (Alberti ve ark., 1998, NCEP raporu, 2002), (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Metabolik sendromla ilişkili unsurlar

Metabolik abnormallikler kümeleşmesi olarak evrensel boyutta tanımlanan MetS şu an tüm dünyada yetişkin nüfusun yaklaşık % 25' ini etkilemektedir (Xia ve Weng, 2010). Özellikle, fast food piyasasında yaşanan patlama, hazır gıda sanayisindeki hızlı yükselişe paralel olarak artan fruktoz tüketimi, kalori bakımından zengin besin maddelerinin yüksek oranda tüketilmesi, hareketsiz yaşam koşulları, egzersiz yapılmaması bireylerde kilo alımını artırmakta, bu da MetS'nin önemli bileşenlerinden olan insülin direnci, hiperglisemi, dislipidemi ve hipertansiyon için zemin hazırlamaktadır.

1.2.1. MetS Tanı Kriterleri

MetS'nin insülin direnci temelinde gelişen bir patofizyolojik durum olduğu ve beraberinde görülen hipertansiyon ve dislipideminin de bu hastalığın gelişimiyle yakından ilişkili olduğu ilk olarak 1998'de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından tanımlanmıştır. Bu tanıma göre, insülin direnci olmaksızın, kişide hipertansiyon ve dislipideminin

görülmesi MetS tanısı koymak için yeterli değildir. Ancak, tip 2 diyabet ile birlikte diğer komponentlerin bir arada görülmesi MetS teşhisinin konulmasında yeterli olmaktadır (Huang, 2009).

1999 yılında ise, EGIR (European Group for Study of İnsulin Resistance) WHO'nun yaptığı tanımlamada değişiklikler yapmıştır. EGIR'in tanımına göre, WHO tanımında olduğu gibi MetS patojenezinde insülin direnci gelişiminin merkezi rolü vurgulanmıştır. Ancak, MetS patojenezindeki insülin direnci, artan plazma insülinin % 75'den fazla olması durumunda tanımlanmalıdır. Çünkü, artan açlık insülini ifadesi tek başına insülin direnci tanımını basitleştirmekle birlikte, T2D'li hastalarda görülen bu durum direk olarak MetS gelişimini ifade etmemektedir. WHO tanımında obezite, kalça oranı veya vücut kitle indeksiyle ifade edilirken, EGIR tanımında bel çevresi obezitesinin önemine değinilmiştir. EGIR tanımında, WHO tanımına benzer şekilde obezite, hipertansiyon ve dislipidemi kriterleri de bulunmaktadır (Balkau ve Charles, 1999).

NCEP ATP III (The US National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III, 2005) güncellenen tanımında, abdominal obezite, hipertrigliseridemi, düşük HDL (high density lipoprotein), hipertansiyon, hiperglisemi kriterlerinin üç veya daha fazlasının birarada görülmesinin MetS teşhisinin koyulmasına uygun olduğu belirtilmiştir. NCEP ATP III tarafından ortaya koyulan tanı kriterleri, MetS'nin patojenezinde önemli rol oynayan hiperglisemi/insülin direnci, viseral obezite, aterosklerotik dislipidemi ve hipertansiyon gibi tüm temel durumları içermesinden dolayı, MetS teşhisinde en çok kullanılan tanım olduğu söylenebilir (Huang, 2009).

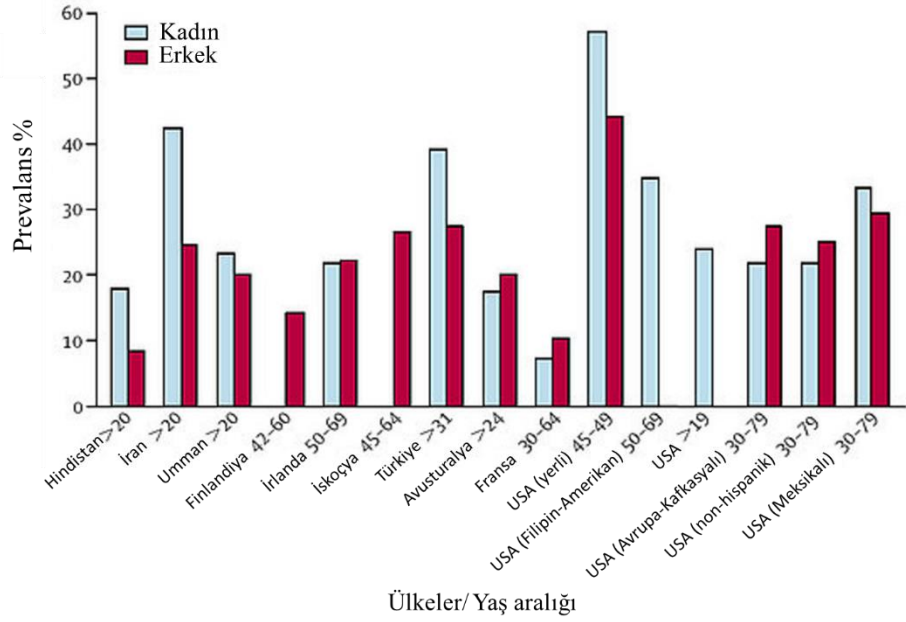
Yukarıda açıklanan tanımların haricinde, 2005 yılında Uluslararası Diyabet Vakfı (IDF) tarafından MetS için yeni kriterler yayınlanmıştır. Bu tanım, diğer kriterlerle aynı genel ölçütleri içermesine rağmen, farklı etnik kökenlere sahip bireylerdeki vücut ağırlığı ve bel çevresi için norm dağılımlarının farklı olması popülasyonlar arasında da obezite kriterlerinin ve riskin farklı olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, IDF tanımında insülin direncinden ziyade viseral obezitenin MetS teşhisinde önemli bir faktör olduğu vurgulanmıştır (Zimmet ve ark., 2005). Günümüze kadar MetS için öne sürülen tanı kriterlerine ait patofizyolojik koşullar ayrıntılı açıklamaları ile Çizelge 1.2' de özetlenmiştir.

Çizelge 1.2. Metabolik sendrom tanı kriterleri

Metabolik Sendrom Tanı Kriterleri			
WHO (World Health Organization) 1999	NCEP-ATPIII (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III) 2005	IDF (International Diabetes Foundation) 2005	EGIR (European Group for Study of Insulin Resistance) 1999
Aşağıdakilerden en az biri: • IR • IGT • T2D		Aşağıdakilerden en az biri: Abdominal obezite *(Bel çevresi: erkek ≥ 94 cm, kadın ≥ 80 cm)	Aşağıdakilerden en az biri: Hiperinsülinemi (plazma insülin > %75)
Aşağıdakilerden en az ikisi: • Hipertansiyon (> 140/90 mmHg) • Dislipidemi (TG> 150 mg/dl veya HDL düzeyi erkek < 35 mg/dl, kadın < 39 mg/dl) • Abdominal obezite *(VKI > 30 kg/m2 veya bel/kalça oranı erkek > 0.90, kadın > 0.85) • Mikroalbuminüri (idrar albumin atılımı > 20 mcg/dakika veya albumin/kreatinin oranı > 30 mg/g)	Aşağıdakilerden en az üçü: • Abdominal obezite *(bel çevresi: erkeklerde > 102 cm, kadınlarda > 88 cm) • Dislipidemi (TG ≥150 mg/dl), Düşük HDL (erkek< 40 mg/dl, kadın < 50mg/dl) • Hipertansiyon (≥ 130/85 mmHg) • Hiperглиsemi (açlık kan glukozu ≥ 110 mg/dl)	Aşağıdakilerden en az ikisi • Dislipidemi (Düşük HDL erkek < 40 mg/dl, kadın < 50 mg/dl, TG ≥ 150 mg/dl) • Hipertansiyon (≥ 130/85 mmHg) • IR/Hiperглиsemi (açlık kan glukozu ≥ 100 mg/dl veya T2D)	Aşağıdakilerden en az ikisi • Abdominal Obezite *(Bel çevresi) 94 cm (Kadın), 80cm (Erkek) • Hiperглиsemi/IR • Dislipidemi (TG 177 mg/dl or HDL <39 mg/dl) • Hipertansiyon (≥ 140/90 mmHg)
Not: IR: İnsülin direnci T2D: Tip 2 diyabet, IGT: Bozulmuş glukoz toleransı *Abdominal obezite kriterleri her popülasyona spesifiktir, Değerler Avrupalı bireyler içindir.			

1.2.2. Metabolik Sendromun Global Prevalansı

MetS prevalansı dünya üzerinde % 20-30 gibi oranlarda seyrederken, araştırılan popülasyonda yaş, cinsiyet, etnik köken, obezite ve tanı kriterlerine bağlı olarak büyük ölçüde değişkenlik göstermektedir (Grundy, 2008; Lam ve LeRoith, 2015). 2004 yılında MetS'nin ülkeler arası prevalanslarının gösterildiği bir çalışmada, hazır gıda tüketiminin oldukça yüksek olduğu ABD ilk sırada yer almaktadır (Cameron ve ark., 2004), (Şekil 1.5). Bunu kadınlarda % 42, erkeklerde ise % 24 oranıyla İran, sonrasında ise kadınlarda % 40, erkeklerde % 28 oranıyla Türkiye izlemektedir (Cameron ve ark., 2004; Kozan ve ark., 2007).



Şekil 1.5. NCEP-ATP III tanımına göre metabolik sendromun global prevalansı (Cameron ve ark., 2004)

Türkiye'deki bölgesel oranlara baktığımızda, % 37.2' lik oranla en fazla Karadeniz bölgesinde görülen bu hastalık, diğer bölgelerde de bu bölgeye yakın oranlarda izlenmektedir (Doğu Anadolu bölgesinde, Ege bölgesinde % 35.8, Akdeniz bölgesinde % 34.3, İç anadolu bölgesinde % 32.8, Marmara Bölgesinde % 32.4, Güneydoğu bölgesinde % 29.2), (Kozan ve ark., 2007).

Şekil 1.6'da görüldüğü gibi, batı toplumlarındaki eğilimlere benzer şekilde, gelişmekte olan birçok ülkede de MetS prevalansı oldukça yüksektir (Vanita ve ark., 2011; Azimi Nezhad ve ark., 2012; Pandit ve ark., 2012), (Şekil 1.6). Bu sonuçlar göz önüne alındığında, MetS hem dünyada hem de ülkemizde giderek daha fazla insanı etkilemeye başlayan mortalite riski yüksek ciddi bir sorundur. Bu nedenle tedavisi, koruyucu ve önleyici tedbirlerin alınması pek çok ülkenin sağlık politikalarında birincil sıraya koyduğu bir olgudur.

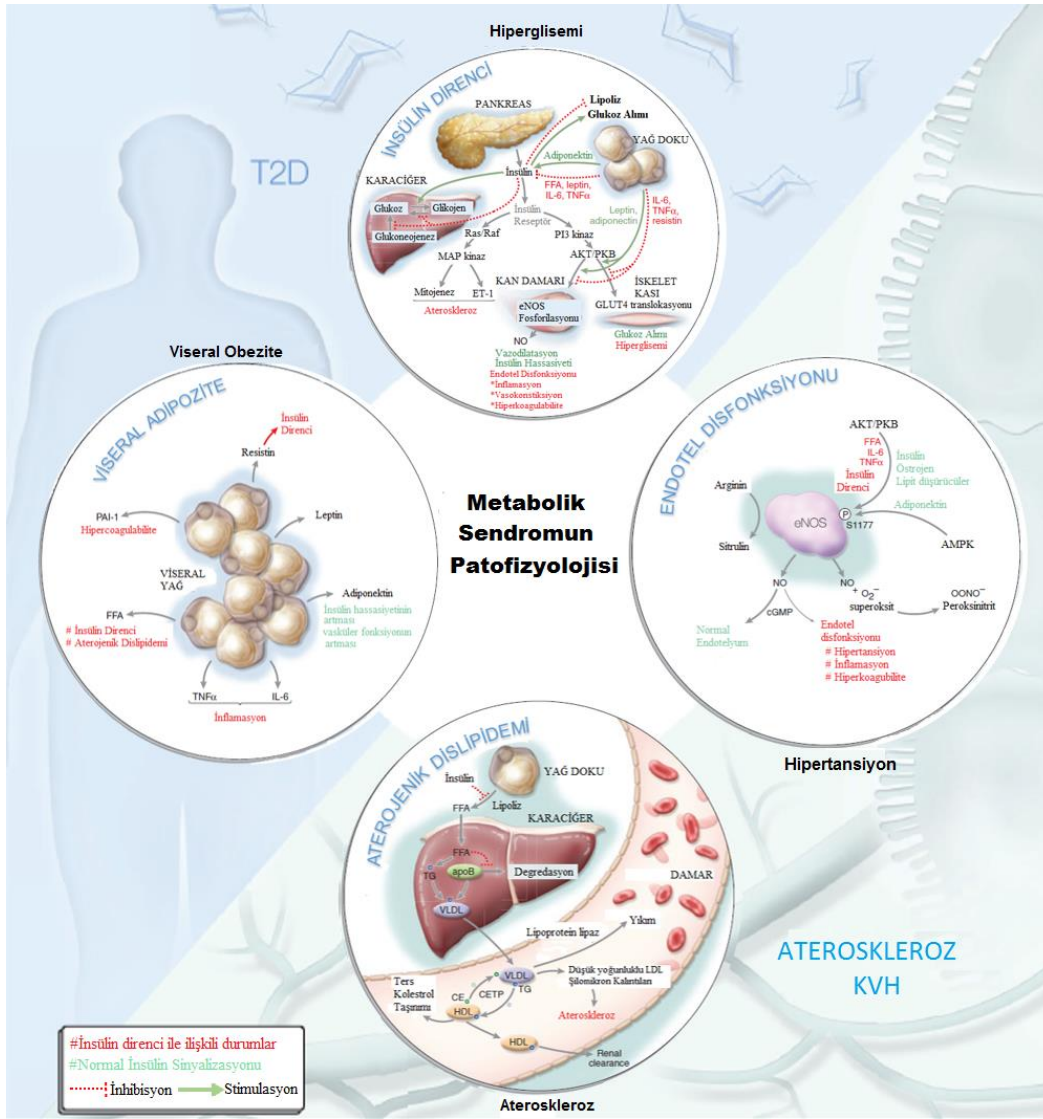


■ Asya- toplam % 31: Erkek: % 20.9, Kadın % 15.5
■ Afrika- Erkek: % 26.6, Kadın % 32.2
■ Avustralya- Erkek: % 48.2, Kadın % 29.9
■ Antartika- Yetişkin: % 30-80, Genç: % 20
■ Avrupa- Yetişkin: % 30-80, Genç: % 20
■ Güney Amerika: % 34
■ Kuzey Amerika: % 35

Şekil 1.6. MetS prevalansının dünya çapında artışı (Vanita ve ark., 2011)

1.2.3. Metabolik Sendrom Patojenezinde Rol Oynayan Metabolik Bozukluklar

MetS patojenezinde başlıca 4 temel komponent: insülin direnci, viseral adipozite, aterojenik dislipidemi, endotel disfonksiyon yer almaktadır. Özellikle, insülin direnci ve dislipideminin MetS gelişimine büyük oranda katkıda bulunduğu bilinmektedir. Dislipidemi aterojenik ve antiaterojenik lipoproteinlerin biyolojik aktiviteleri, metabolizmaları ve yapılarında meydana gelen anormalliklerle karakterize edilir. MetS patojenezinde insülin direnci ve dislipidemiye takiben, serum TG (trigliserit) seviyesinin yüksekliği ve HDL seviyesinin düşüklüğü ile karakterize edilen aterojenik dislipideminin de önemli rolü vardır (Semenkovich, 2006). Aterojenik dislipidemi ve insülin direncine bağlı olarak gelişen endotel disfonksiyon, aterosklerozis ve kardiyovasküler hastalıkların (KVH) gelişiminde mekanistik anlamda önemli role sahiptir. Bahsedilen bu 4 komponentin yanı sıra, MetS patojenezinde düşük seviyeli kronik inflamasyon, oksidatif stres, hiperaguabilite, mikroalbuminüri gibi durumlarda yer almaktadır. MetS patofizyolojisinde rol oynayan durumlar ve mekanizmalarına ilerleyen bölümlerde ayrıntılı şekilde değinilmiştir. MetS patofizyolojisinde yer alan komponentler ve bunlarla ilgili hastalıklar Şekil 1.7' de şematize edilmiştir (Huang, 2009; Kaur, 2014).



Şekil 1.7. Metabolik sendromun patofizyolojisi (Huang, 2009'dan uyarlanmıştır)

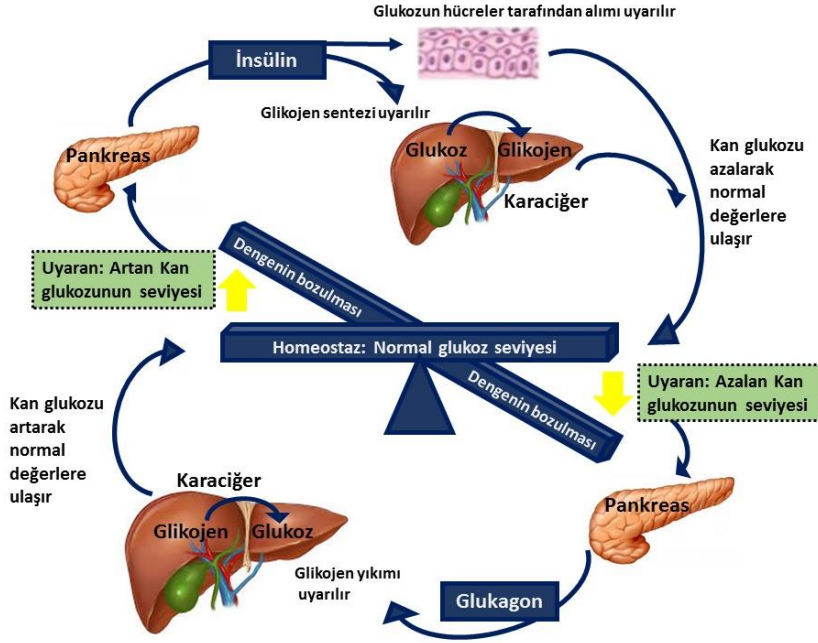
1.2.3.1. Glukoz Homeostazı ve İnsülin Direnci

Tüm hücreler için primer enerji kaynağı olan glukoz, hücrelerin metabolik ihtiyaçları doğrultusunda diyetel ve endojen olarak iki şekilde sağlanabilir: i) Diyetel glukoz besin alımını takiben bağırsaktan emilerek vücudun çeşitli doku ve organlarına ulaşırken, ii) açlık durumunda glikojenolizis ve glukoneojenezis (% 85'i karaciğerde) aracılığıyla üretilen endojen glukoz plazmaya verilerek hücrelere ulaşır (Bryant ve ark., 2002; DeFronzo, 2004). “Peki sağlıklı bireyler glukozu nasıl kullanır?” Bu sorunun en genel yanıtı şudur: Beslenmeyi takiben emilimi tamamlanan glukozun 2 alternatif yolu vardır; ya okside edilerek hücresel enerjiye dönüştürülür ya da glikojen veya trigliserit olarak depolanır (DeFronzo, 2004; Norberg, 2006). İnsanlarda beslenme ve açlık arasındaki glukoz konsantrasyon değişimlerinden dolayı kan glukoz seviyesinin 4-10 mmol/L gibi dar

bir aralıkta tutulması gerekmektedir (Grasman ve ark., 2017). Plazma glukoz konsantrasyonunun kompanse edilemeyecek kadar yüksek seviyelere çıkması (10 mmol/L üstü) durumunda ciddi komplikasyonlar oluşabilmektedir. Diğer yandan, glukoz seviyesinin 4 mmol/L altına düşmesi de akut beyin hasarı gibi ciddi sorunlara yol açabilmektedir. Bu nedenle bu dengenin korunması metabolik işlevlerin normal şekilde sürdürülmesi açısından önemlidir. Plazma glukoz konsantrasyonu homeostazında pankreasın α ve β hücrelerinden salınan insülin ve glukagon hormonları önemli role sahiptir (Desvergne ve ark., 2006).

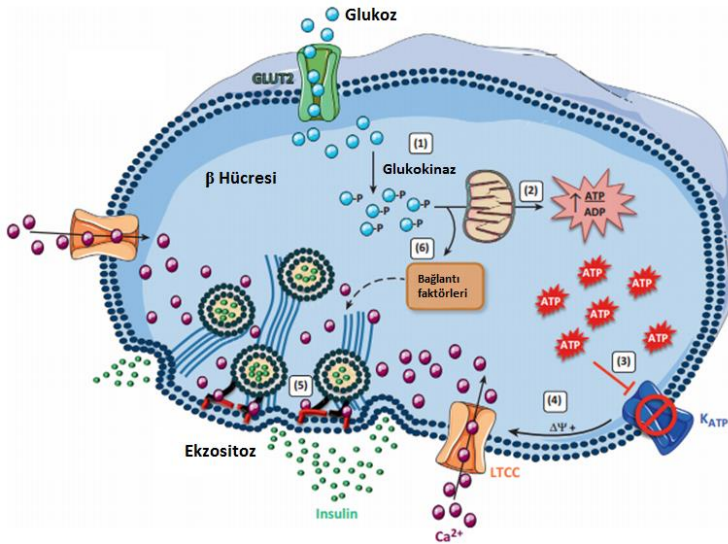
HücreSEL enerji üretimi için önemli bir substrat olan glukozu yanıt olarak pankreatik beta hücrelerinden salınan insülin, i) karaciğer, kas ve adipositlerde glukoz alımının artmasını, ii) hepatik glukoz üretiminin baskılanmasını, iii) fazla glukozun glikojene yada trigliseritlere dönüşümünü sağlayarak metabolik etkisini göstermektedir. Böylece normal fizyolojik koşullar altında postprandiyal periyot sonrası plazmada artan glukoz konsantrasyonuna yanıt olarak salınan insülin, glukoz metabolizmasını sıkı şekilde kontrol ederek plazma seviyesinin normal sınırlar içinde kalmasını sağlar. Daha açık şekilde, insülin bahsedilen metabolik etkisini periferik dokularda glukoz oksidasyonunu, glikojen sentezini ve lipojenezi artırarak, glukoneojenezi ve glikojenolizi baskılayarak gerçekleştirmektedir. İnsülin tüm bu etkilerini hücre içinde enzimlerin fosforilasyon durumlarını etkileyerek, anahtar regülatör proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarının ve aktivitelerinin değişmesine aracılık ederek gerçekleştirir (Cohen ve ark., 1997). Yanı sıra, insülin gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyonel ve transkripsiyonel faktörleri etkileyerek sayısız proteinin regülasyonunda rol alır (Rome ve ark., 2003; Norberg ve ark., 2006).

Beslenme ve açlık arasında insülin seviyesi düştüğünde ise, glukagon hormonu çeşitli mekanizmalarla plazma glukoz seviyesini artırır. Karaciğer, plazma glukoz konsantrasyonu azaldığında, glukagon aracılığıyla glukoneojenezisi ve glikojenolizi artırır, hepatik glukoz çıkışını sağlayarak bir nevi tampon görevi yapmaktadır. Artan plazma konsantrasyonuna karşılık, karaciğerde glikojen depolanma kapasitesi aşıldığında ise, adipoz doku fazla glukozu triaçilgliserollere dönüştürerek uzun sürede yağ depolanmasını sağlamaktadır (Marieb ve Hoehn, 2013; Desvergne ve ark., 2006). Şekil 1.8 'de pankreastan salınan insülin ve glukagon aracılığıyla plazma glukoz seviyesinin düzenlenmesi şematize edilmiştir.



Şekil 1.8. Pankreastan salınan insülin ve glukagon aracılığıyla plazma glukoz seviyesinin düzenlenmesi (Marieb ve Hoehn, 2013'den uyarlanmıştır)

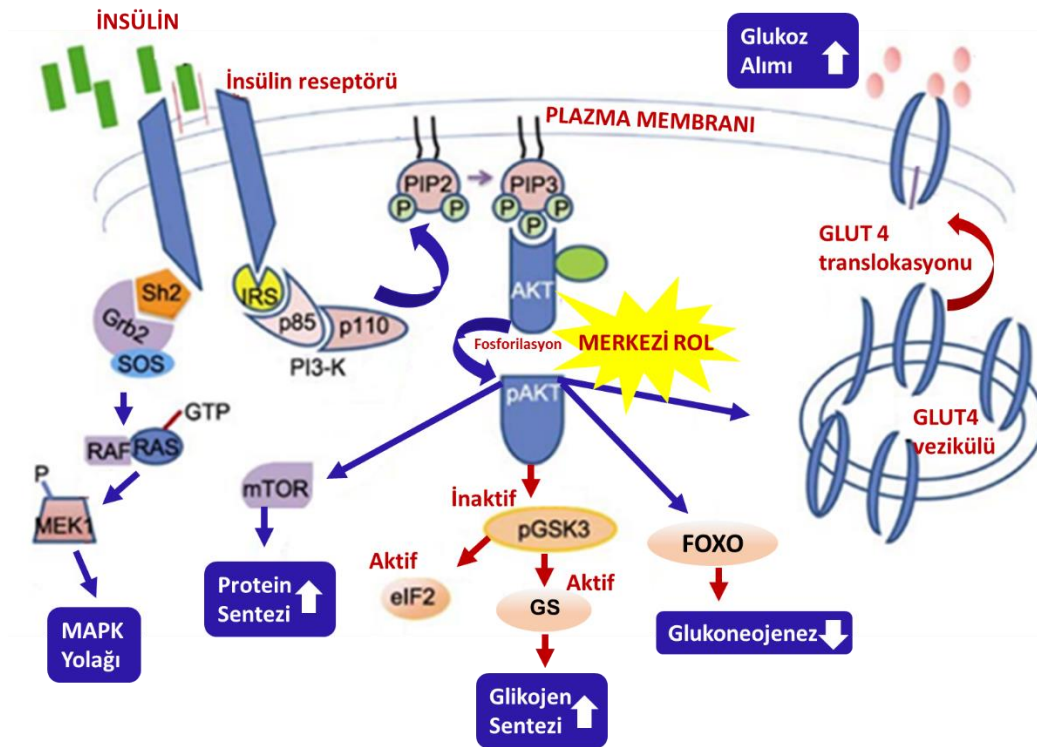
İnsülin, pankreatik hücrelere glukozun girişi ve metabolizması sonucu hücre içi ATP/ADP oranındaki artışa bağlı olarak salınmaktadır (Mancini ve Poitout, 2013). Artan plazma glukoz konsantrasyonuna yanıt olarak, β hücreleri glukoz taşıyıcıları aracılığıyla (GLUT2) aracılığıyla glukozun hücre içine alınmasını sağlamaktadır. Sonrasında hücre içine alınan glukoz glukokinaz enzimi aracılığıyla glukoz-6-fosfata (G6P) dönüştürülerek glikolitik yolağa girmektedir. Glikoliz sonucu oluşan piruvat trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne girerek yüksek ATP üretimi ve ATP / ADP oranındaki artışa neden olmaktadır (1,2). ATP ile ilişkili potasyum kanallarının kapatılması plazma membranının depolarizasyonuna ve sonucunda da Ca^{+2} kanallarının (L-tipi Ca^{+2} kanalları, LTCC) açılmasını sağlamaktadır (3). Son olarak, LTCC'ler aracılığıyla gerçekleşen ekstraselüler Ca_2^+ akışı, insülin granüllerinin β hücre plazma membranı ile kaynaştırılmasında rol oynayan ekzositotik mekanizmaları aktive ederek insülinin salınmasını sağlamaktadır (4, 5), (Mancini ve Poitout, 2013), (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Glukozla uyarılan insülin salınımının mekanizması (Mancini ve Poitout, 2013'den uyarlanmıştır)

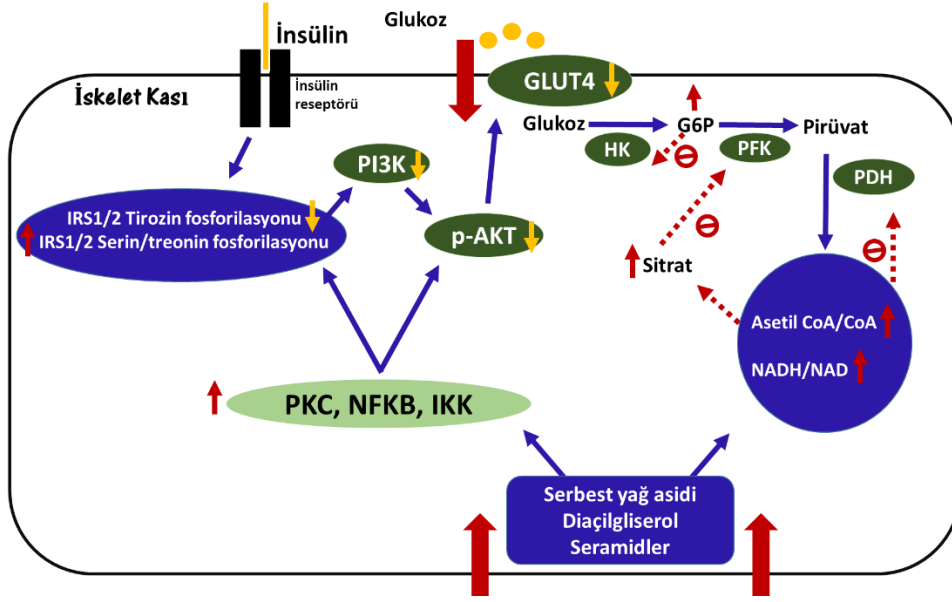
Glukoz kullanımının % 80 oranda gerçekleştiği primer organ iskelet kasıdır. İskelet kası insan vücudunda hem glukozu hem de serbest yağ asitlerini enerji kaynağı olarak kullanan en aktif dokudur. (DeFronzo ve ark., 1981). Glukoz emilimini takiben, plazma glukoz konsantrasyonundaki artış, pankreatik beta hücrelerinden insülin salınımını uyararak iskelet kasında glukoz alımını sağlamaktadır. Glukoz taşıyıcıları aracılığıyla hücre içine alınan glukoz, hekzokinaz tarafından fosforillenerek ya glikojen olarak depolanmakta, ya da oksidasyon için glikolitik yolağa girmektedir. Açlık durumunda ise, iskelet kasında glukoz alımı düşüktür, glukoz yerine plazmadaki SYA'lar iskelet kasında primer enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. İnsülin periferel dokulardaki sinyalizasyonunu hücre yüzeyinde bulunan reseptörüne bağlanarak başlatmaktadır. İnsülin reseptörü, 2 α ve 2 β altbiriminden oluşan tirozin kinaz enzim ailesine bağlı bir glikoproteindir. İnsülin, reseptörünün α altbirimine bağlandığında meydana gelen otofosforilasyon, β altbirimindeki tirozin kinaz aktivasyonuna neden olmaktadır (Bilous ve Donnelly, 2010). Sonrasında downstream yolağındaki insülin reseptör substratının (IRS1-2) fosforilasyonu gerçekleşir (Uchida ve ark., 2000). Akabinde fosfoinositol 3-kinaz (PI3K) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolaklarının aktivasyonu gerçekleşir. İnsülin, mitojenik etkilerini MAPK) yolağı, metabolik etkilerini de PI3K yolağı aracılığıyla göstermektedir. İnsülin metabolik etkilerini insülin reseptörünün otofosforilasyonu, IRS moleküllerinin tirozin fosforilasyonu ve PI3K aktivasyonu ile gerçekleştirir. Aktive olan PI3K, AKT molekülünün Ser473 rezidülerinden

fosforilasyonunu sağlayarak, glukozun hücre içine alınmasını aracılık eder. PI3K-AKT yolağı, insülinin metabolik etkilerinin çoğundan sorumludur. İskelet kası ve adipoz dokuda aktive olan AKT, sitoplazmada veziküller içerisinde bulunan glukoz taşıyıcılarının (GLUT4) hücre membranına translokasyonunu uyararak glukoz alımını artırmaktadır (Huang, 2009; Satiel ve Kahn, 2001). AKT molekülünün insülin sinyalizasyonunda merkezi bir rolü bulunmaktadır. Hücre içerisine glukoz alımındaki anahtar rolünün yanı sıra, GSK3 (Glikojen sentaz kinaz 3) inaktivasyonu da AKT molekülü aracılığıyla düzenlenmektedir. Bu durum glikojen sentazın (GS) aktivasyonuna dolayısıyla glukozun glikojen olarak depolanmasını sağlamaktadır (Alessi, 2001). AKT fosforilasyonunu takiben, nukleustan sitoplazmaya translokasyonu gerçekleşen FOXOA (Forkhead transkripsiyon faktörü A) proteinleri, PEPCK (Fosfoenolpiruvat karboksikinaz) ve G6Paz (Glukoz 6 Fosfataz) gibi karaciğer ve böbrekte glikojenoliz ve glukoneojenezde görev alan hız sınırlayıcı enzimlerin gen ekspresyonlarını düzenleyerek, glukoz homeostazının sürdürülmesinde aktif rol oynamaktadır (Wolfrum ve ark., 2003; Kumar ve ark., 2012). Şekil 1.10' da insülin sinyalizasyonunun şematik gösterimi sunulmuştur. İnsülin hassasiyetinin azaldığı, insülin direncinin olduğu durumlarda yukarıda bahsedilen metabolik düzenlemelerin pek çoğunda bozukluklar meydana gelmektedir.



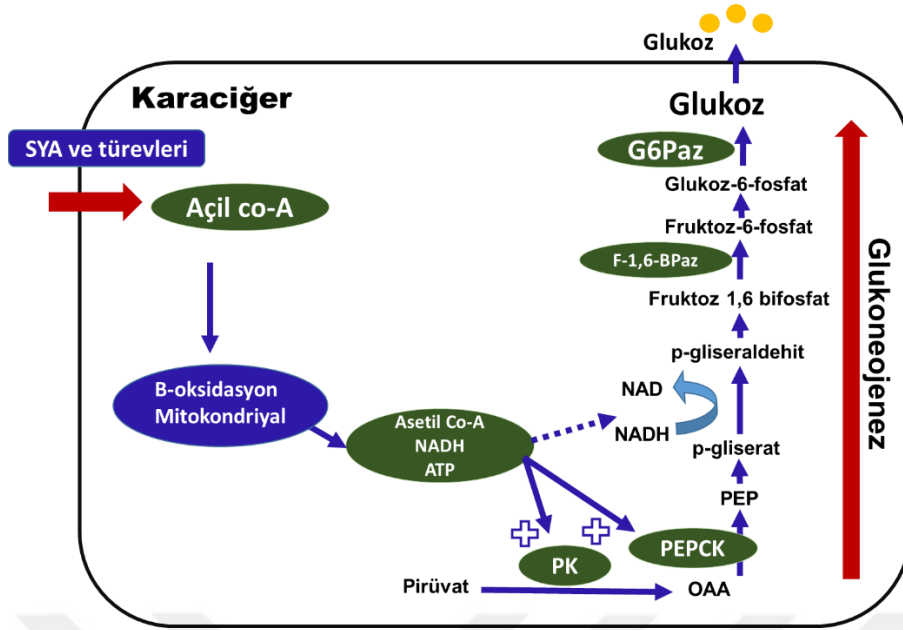
Şekil 1.10. İskelet kasında insülin sinyalizasyonunun şematik diyagramı

MetS patojenezinde anahtar rol oynayan insülin direnci, insülinin dolaşımdaki normal seviyesine yanıtın azalması olarak tanımlanan patofizyolojik bir durumdur (Savage ve ark., 2007; Zimmet ve ark., 2001). İnsülin direnci aynı zamanda dolaşımdaki SYA artışı ve lipit metabolizmasındaki bozukluklar sonucu iskelet kası, karaciğer, adipoz doku gibi insüline duyarlı dokularda hassasiyetinin azalması olarak da tanımlanabilir (Defronzo, 2004; Defronzo, 2009; Ragheb ve Medhat, 2011). İskelet kasında, yağ asidi ile indüklenen insülin direncinin mekanizması Şekil 1.11’de özetlenmiştir. Buna göre, iskelet kasında, dolaşımda artan SYA ve türevlerinin, serin/treonin kinazları (protein kinaz C-PKC), nuklear faktör kappa B (NFkB), inhibitör kappa B kinase (IKK β) moleküllerini aktive ederek, IRS1/2 moleküllerinin serin fosforilasyonuna ve AKT inaktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bu durumda, insülin sinyal yolağında görevli diğer molekülleri regüle eden PI3K-AKT yolağındaki sinyalizasyon bozulmakta ve bağımlı glukoz alımı azalmaktadır (Ragheb ve ark., 2008). Ayrıca SYA’ların hücre içi konsantrasyonlarının artması, mitokondriyal asetil CoA seviyesini artırarak, piruvat dehidrogenazı inaktivasyonuna ve sitrat konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır. Bu durum da glikolitik yolda önemli rolü bulunan fosfofruktokinaz enziminin inhibisyonuna yol açarak G6P birikimine ve heksokinazın inhibe olmasına neden olmaktadır. Tüm bunların sonucu olarak, hücre içi glukoz konsantrasyonu artmakta dolayısıyla glukoz alımı azalmaktadır (Delarue ve Magnan, 2007; Schinner ve ark., 2005), (Şekil 1.11). Yukarıda açıklanan patofizyolojik bozuklukların MetS gelişimine katkı sağlayan temel mekanizmalar olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1.11. İskelet kasında yağ asidi ile indüklenen insülin direncinin moleküler mekanizması

Yanlış beslenme sonucu dolaşımda artan SYA'lar, iskelet kasında insülin direncine zemin hazırlarken, hepatik glukoz metabolizmasını da etkileyerek açlık hiperglisemisine katkıda bulunmaktadır. Serbest yağ asidi ve türevlerinin hepatik glukoz metabolizması üzerindeki en temel etkisi glukoneojenezin uyarılmasıdır. Hücre içine alınan SYA'ların β -oksidasyonu, NADH ve ATP aracılığıyla PEPCK ve pirüvat karboksilaz enzimlerini uyararak asetil Co-A üretiminin artmasına neden olmaktadır. Diğer deyişle, Asetil Co-A, glukoneojenez yolağında görev alan önemli regülatör enzimlerin miktarındaki artışlara neden olarak glukoz miktarını artırmaktadır (Lam ve ark., 2003; Boden ve ark., 2001; Delarue ve Magnan, 2007), (Şekil 1.12). Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda, birçok metabolik anormal mekanizmanın intramiyosellüler ve intrahepatik lipit birikimini artırmasıyla çok sayıda hücrel mekanizmayı etkilediği ve insülin direnci gelişimini indüklediği söylenebilir.



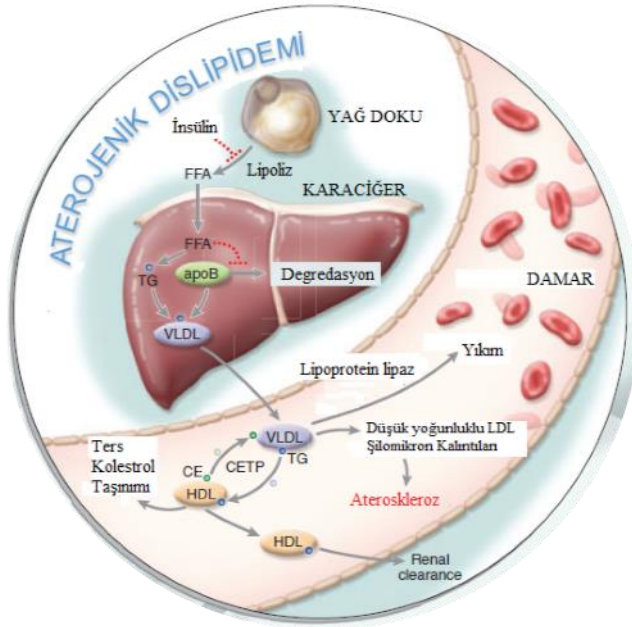
Şekil 1.12. Karaciğerde yağ asidi ile indüklenen insülin direncinin moleküler mekanizması

1.2.3.2. Aterojenik Dislipidemi

MetS, bileşenlerinin, nedenlerinin ve sonuçlarının iç içe geçtiği kompleks bir durumdur. Hastalığın etiyopatogenezindeki en önemli iki mekanizma, insülin direnci ve beraberinde gelişen aterojenik dislipidemidir. MetS'nin önemli bir bileşeni olan dislipidemi, artan total kolesterol, TG, LDL (low density lipoprotein) ve azalan HDL seviyeleri ile karakterize edilmektedir (Ginsberg, 2000).

Lipit metabolizmasının düzenlenmesinde birçok lipoprotein görev almaktadır. VLDL (very low density lipoprotein)' den köken alan LDL partikülleri dolaşımdaki total kolesterolün büyük bir kısmının periferel dokulara taşınmasında görevli lipoproteinlerdir. Dolaşımda yüksek miktarda bulunmaları arteriyel plak oluşumuna dolayısıyla ateroskleroz gelişimine zemin hazırlamaktadır. Şilomikronların hidroliz sonucu oluşan yüksek yoğunluklu HDL partikülleri ise, periferel hücrelerden kolesterolün alınarak karaciğere taşınmasını sağlar (Whitney ve Rolfes, 2007). Bu nedenle, HDL'nin antioksidatif, antiinflamatuvar, antiaterosklerotik ve antitrombotik gibi önemli özellikleri vardır. Metabolik sendromda anahtar rol oynayan insülin direnci ve beraberinde gelişen dislipidemi arasındaki bağlantıya bakıldığında, insülin direncinin, çeşitli yollarla aterojenik dislipidemide artışa neden olduğu görülmektedir. Bu yollardan birincisi, adipoz dokuda hormon duyarlı lipaz enzimini inhibe ederek dolaşımdaki serbest yağ asitlerini azaltan insülinin, insülin direnci durumunda, bu antilipolitik etkisinin ortadan kalkmasıdır. Böylece, adipoz dokudaki trigliseritler hormon duyarlı lipaz enzimi tarafından serbest yağ

asitlerine dönüşerek kana verilmektedir. Diğer yandan, visceral obezitenin lipolitik yolağı aktive etmesi de esterleşmemiş yağ asitlerinin dolaşımdaki miktarını artırmaktadır. Dolaşımda miktarı artan SYA'lar, karaciğerde TG sentezi için bir substrat görevi görürken, aynı zamanda VLDL'lerin yapısında bulunan apoB üretimini stabilize ederek daha fazla VLDL üretimine neden olmaktadır. İkinci olarak, insülin normal koşullarda PI3K'ya bağlı yolak vasıtasıyla, apoB'yi degrade etmektedir. Bu nedenle insülin hassasiyetinin azaldığı durumda, doğrudan VLDL üretimi artmaktadır. Öte yandan, karaciğerde hiperinsülinemiye bağlı olarak, selektif post reseptör direnci denilen bir mekanizmayla insülin bağımlı lipojenez artmaktadır (Semple ve ark., 2009). Bunun sonucunda karaciğerden bol miktarda trigliserit bakımından zengin VLDL partikülleri sentezlenerek kana verilmektedir. Son olarak, VLDL'nin dolaşımdan alınmasını düzenleyen lipoprotein lipaz molekülünün, insülin direnci durumunda fonksiyonunu yerine getirememesi VLDL'nin dolaşımdan alınamamasına ve hipertrigliseridemiye neden olmaktadır (Kaur, 2014). İnsülin direnci, bahsedilen tüm bu mekanizmalar aracılığıyla, plazmada bulunan kolesterol ester transfer protein (CETP), HDL ve LDL'de bulunan kolesterol esterlerini, VLDL'de bulunan trigliserit ile değiştirerek, HDL-kolesterol seviyesini azaltırken, atorejenik küçük yoğunluklu LDL partiküllerinin birikmesini kolaylaştırır. Sonuç olarak, dolaşımda HDL'nin seviyesinde azalma, apolipoprotein B (apoB), TG ve VLDL seviyelerinde meydana gelen artışlar MetS patojenezine katkıda bulunmaktadır. Dolayısıyla, insülin direnci kaynaklı düşük HDL-C ve yüksek TG seviyeleri kapsayan anormal MetS lipit profili ortaya çıkmaktadır (Ginsberg ve ark., 2005; Kaur, 2014; Huang, 2009), (Şekil 1.13). Gerek karaciğer gerekse adipoz dokuda meydana gelen bu değişiklikler metabolik sendromda ortaya çıkan dislipideminin en önemli kaynağıdır (Miranda ve ark., 2005). İnsülin direnci ile ilişkili atorejenik dislipideminin karaciğerin artmış VLDL sekresyonunun doğrudan sonucu olduğuna inanılmaktadır. Bahsedilen tüm bu abnormallikler, oksidatif stres ve endotel disfonksiyonunun artması ve ilerleyen süreçte MetS'nin bir sonucu olarak KVH gelişimi ile yakından ilişkilidir.



Şekil 1.13. Aterojenik dislipidemisinin gelişimi (Huang, 2009'dan uyarlanmıştır)

1.2.3.3. Viseral Obezite

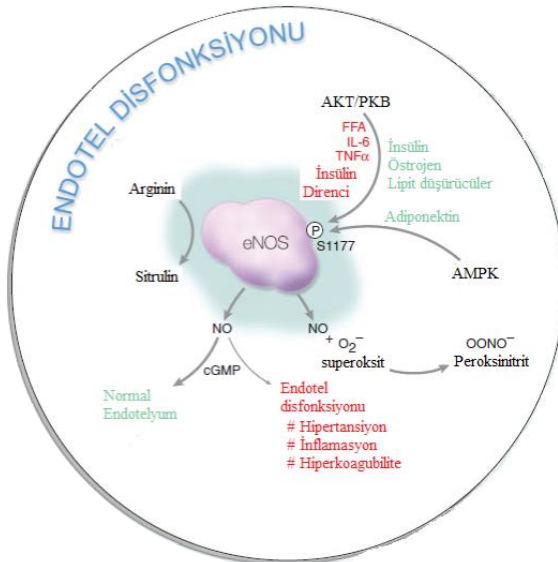
İnsülin direnci ve aterojenik dislipidemi temelinde gelişen viseral obezite, MetS'nin dört önemli bileşeninden biridir. Obezite; hipertansiyon, koroner kalp hastalığı, T2D ve MetS gelişimine büyük oranda zemin hazırlayan, lipojenik ve lipolitik işlevler arasındaki dengesizlik sonucu adipoz dokuda aşırı miktarda yağın trigliseritler şeklinde depolanmasıyla karakterize edilen ve büyük bir kitleyi etkileyen bir halk sağlığı problemidir (Langin, 2006). Sağlıklı bireyler adipoz dokuda fazla enerjiyi trigliserit olarak depolayarak pozitif enerji dengesine yanıt verirken, aşırı enerji kaynağı alımı ile depolanma kapasitesini aşan bireylerde fazla kilo alımını takiben ilerleyen dönemlerde obezite ortaya çıkmaktadır (Unger, 2003). İnsülin glukoz metabolizmasındaki etkisinin yanı sıra, lipit metabolizmasında da rol oynayan önemli bir anabolik hormondur. Plazma insülin konsantrasyonunun artması adipositlerde gerçekleşen lipolizi baskılamada temel faktördür. Sağlıklı bireylerde lipoliz farklı dokulardaki enerji ihtiyacı doğrultusunda uygun enerji kaynağının sağlanması için sıkı şekilde düzenlenmektedir (Langin, 2006; Delarue ve Magnan, 2007). Postabsorvatif fazda (beslenmeyi takiben 10-12 saat) lipolizin artmasıyla karaciğer SYA'ları temel enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Uzamış açlıkta ise, SYA'lar karaciğerde keton cisimciklerine çevrilerek, beyinin enerji talebi karşılanmaktadır (Cahill ve George, 2006). Egzersiz gibi yüksek enerji gerektiren durumlarda ise, glikojen stoklarının hızlı şekilde kullanılması söz konusudur. Bu nedenle, normal metabolik koşullarda lipolizin artması, glukoz bağımsız enerjinin elde edilmesini sağlamaktadır.

Postprandiyal periyot sonrası ise, artan plazma insülini, yağ dokuda trigliseridlerin (TG) serbest yağ asidi (SYA) ve gliserole hidrolizini sağlayan enzim olan hormon duyarlı lipazı (HSL) inhibe ederek lipolizi baskılama işlevini gerçekleştirmektedir (Lam ve LeRoith, 2015). İnsülin, lipoliz üzerindeki baskılayıcı etkisinin yanı sıra, lipit metabolizmasında rol oynayan pek çok molekülün regülasyonundan da sorumludur. Glukoz taşınımı ile glukoz ve yağ asitlerinin hücrel metabolizmasından sorumlu moleküllerin transkripsiyonunu kontrol eden nükleer reseptör PPAR- γ 'yı uyararak adipogenezi ve yağ dokusu farklılaşmasını da teşvik etmektedir (Armoni ve ark., 2007; Scazzocchia ve ark., 2011). İnsülin direnci durumunda ise, glukoz metabolizmasında olduğu gibi lipit metabolizmasında da birtakım anormallikler sözkonusudur. Adipositlerde gelişen insülin direnciyle birlikte, adipositlerden salınan glukoz homeostazının düzenlenmesinde görevli adipokinlerin salınımında bozukluklar meydana gelmektedir. Aynı zamanda, obeziteyle birlikte genişleyen adipositlerden proinflamatuvar kökenli moleküllerin salınımı artmakta ve insülin sinyalizasyonunda aksaklıklar meydana gelmektedir. İnsülin direnci gelişimiyle, insülinin lipoliz üzerindeki baskılayıcı etkisi azaldığından, lipolizin artmasıyla birlikte SYA, diaçilgliserol ve seramidler gibi hücre içi lipit türevlerinin birikimi, inflamatuvar sinyalizasyonu, oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyon gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla insülin direncine yol açabilmektedir. Buna ek olarak, viseral adipoz dokuda görülen yüksek lipolitik aktivite ile dokulara SYA akışını artması tüm vücutta insülin direnci gelişiminin nedeni olarak düşünülmektedir. Çünkü, viseral obeziteyle birlikte dolaşımdaki SYA seviyeleri arttıkça, yağ dokusunun SYA'ları alıp tutma kapasitesi aşmaktadır. Bu durum diaçilgliserol (DAG), triasilgliserol ve seramidler gibi SYA türevlerinin sınırlı lipid depolama yeteneği olan karaciğer, iskelet kası, böbrek, pankreas gibi ektopik dokularda birikimine neden olmaktadır (Yki-Jarvinen, 2005). Bu yüzden, SYA'ların dolaşımdaki seviyelerinin artması, insülin direncinin bir sonucu değil, aynı zamanda nedeni de olabilmektedir. Dolayısıyla, viseral obezitenin gelişimi insülin direnciyle alakalı olarak metabolik yollarda birtakım sorunlara yol açmakta ve MetS için büyük oranda risk oluşturmaktadır.

1.2.3.4. Endotel Disfonksiyonu

MetS bileşenlerinden biri olan endotel disfonksiyonu aynı zamanda insülin direnci ve T2D gelişim riskini artıran, ateroskleroz patojenizinde rol oynayan bir durumdur (Kim ve ark., 2006; Huang, 2005) Kan damarlarının iç yüzeyini kaplayan endotel hücreleri önemli mekanik ve biyolojik fonksiyonları yerine getirirler. Bu hücreler, NO, prostasiklin ve

endotelin gibi çeşitli vazoaktif maddeler üreterek fizyolojik ve patolojik uyarılara karşı yanıt vermektedir. Hücre adhezyon moleküllerinin endotel ekspresyonları dolaşımdaki lökosit ve monositlerin etkileşimini sağlayarak inflamasyonu, trombositler ile etkileşimini sağlayarak, trombozis ve hemostazı kontrol etmektedir. Metabolik sendrom patojenezinde rol oynayan endotel disfonksiyonunu açıklayan birkaç mekanizma vardır. Bunların en önemlilerinden biri, insülinin hemodinamik etkisi aracılığıyla gerçekleşen eNOS fosforilasyonunda azalmanın meydana gelmesidir. İnsülin direnci ve obeziteyle gelişimiyle birlikte, TNF- α , IL-6 gibi inflamatuvar sitokinler aracılığıyla gerçekleşen IRS-1 inaktivasyonu AKT fosforilasyonunu azaltmaktadır. İnsülin direnci durumunda PI3K-AKT yolağının inhibe olması, eNOS inaktivasyonu sonucu endotel nitrit oksit salınımını azalmasına neden olur. Dolayısıyla bu durum endotel disfonksiyonu gelişimine neden olmaktadır (Şekil 1.14). Bu durumda lokal kan akışı azaldığından, iskelet kası ve adipoz dokuda GLUT4 translokasyonu azalmakta ve glukoz alımı engellenmektedir. Ayrıca, insülin hassasiyetinin azalmasıyla dolaşımda artan SYA'ların neden olduğu PI3K-AKT sinyal bozukluğu ROS ve endotelin-1 üretiminin artmasına ve endotel disfonksiyonu gelişimine katkı sağlamaktadır. Tüm bunlara ilaveten oksidatif stress, hiperglisemi, glikozillenmiş ürünler, SYA'lar, inflamatuvar sitokinler gibi birçok faktör, endoteliumun normal fizyolojik ve koruyucu yeteneğini azaltmaktadır (Huang, 2009).



Şekil 1.14. Endotel disfonksiyonunun gelişimi (Huang, 2009'dan uyarlanmıştır)

1.2.3.5. Kronik İnflamasyon ve Oksidatif Stresin Metabolik Sendrom Patojenezindeki Önemi

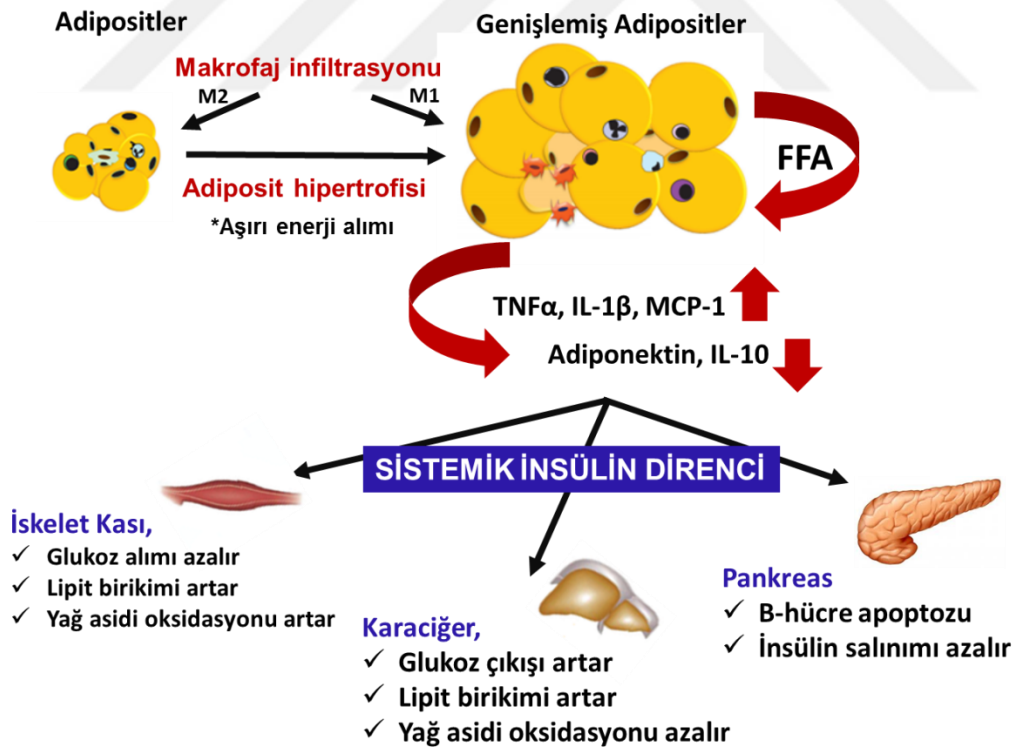
Düşük seviyeli kronik inflamasyon ve oksidatif stres gibi durumlar insülin direncine aracılık etmeleri ve MetS patojenezinde yer alan diğer mekanizmalara katkıda bulunması nedeniyle MetS gelişimi açısından oldukça önemlidir.

Obezite ile birlikte genişleyen adipoz dokudan salınan antiinflamatuvar ve inflamatuvar özellikteki moleküllerin seviyesinde meydana gelen dengesizlik, çeşitli dokularda immün sistem aktivasyonuna dolayısıyla metabolik dengede değişimlere neden olmaktadır. Adipoz dokuda yapılan gen ekspresyon analizleri, obezitenin makrofaj aktivasyonu ile ilgili genlerin seviyelerini artırarak metabolik sendrom için büyük oranda risk faktörü oluşturduğunu göstermiştir (Lumeng ve Saltiel, 2011).

Enerjinin depolandığı temel bölge olan adipoz doku adipositokinler olarak adlandırılan sinyal proteinlerini üretmektedir. Bu sinyal proteinleri enerji dengesinin düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Adipositlerden salınan proinflamatuvar özellikteki IL-6, TNF- α , IL1 β gibi birçok adipositokinin insülin direnci gelişimine doğrudan etkisi olduğu bilinirken, IL-10, adiponektin gibi antiinflamatuvar özellikteki adipositokinlerin periferik dokularda insülin hassasiyetini artırdığı bilinmektedir. Adipoz doku genişlemesinin yol açtığı hipertrofi nedeniyle adipositlerin daha fazla oksijene ihtiyaç duymaları hücrel stres yolağının aktivasyonuna ve hipoksiye neden olur. Dolayısıyla bu olumsuz etki inflamatuvar yanıtın tetiklenmesine ve bahsedilen proinflamatuvar özellikteki moleküllerin salınmasına aracılık etmektedir. Obeziteyle birlikte genişleyen adipositlere makrofajların infiltrasyonu artmakta bu da proinflamatuvar özellikteki moleküllerin (TNF- α , IL-6 ve IL-1 β) salınımını teşvik etmektedir. Bu moleküllerin karaciğer, iskelet kası, pankreas gibi metabolik dokuları etkileyerek insülin direnci gelişimine aracılık ettiği bilinmektedir.

Bahsedilen mekanizma dışında, insülin direnci gelişimiyle adipoz dokuda lipozin artmasıyla SYA miktarlarında görülen artışların, direk olarak TLR (Toll like receptor: patojen tanıyıcı reseptör) ailesi üyeleri ile etkileşime girerek inflamatuvar özellikteki moleküllerin salınımını artırıp inflamatuvar sinyal yolağını aktive ettiği bilinmektedir. (Wellen ve Hotamışlıgil, 2005; Martins ve ark., 2012). Yapılan *in vitro* çalışmalarda, SYA'ların makrofaj hücrelerinde TLR-2 ve TLR-4 aracılığıyla inflamatuvar sinyal iletimini aktive edebileceği gösterilmiştir. Farelerde yapılan çalışmalar TLR-4 reseptörünün fonksiyon kaybının, diyet kaynaklı obezite ve doymuş yağ asidine bağlı insülin direncine karşı koruyucu etki sağladığını göstermiştir (Tsukomo, 2007). Jialal ve ark.'larının (2012)

yaptıkları çalışmada ise, MetS'li bireylerde sağlıklı bireylere kıyasla, bu reseptörlerin aktivite ve ekspresyon seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. TLR reseptörlerinin aktivasyonu, inflammatuar yolaktaki JNK ve IKK moleküllerinin aktivitelerini artırarak, NF- κ B'nin sitozolik inhibitörü olan I κ B α 'nın engellenmesine ve NF- κ B aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu durum, insülin sinyalizasyonunda görevli IRS-1'in serin rezidülerinden fosforillenmesine ve insülin sinyal iletiminin bozulmasına neden olmaktadır (Hotamışlıgil, 2008; Bhargava ve Lee, 2012). Obezite ile birlikte inflammatuar yolağın aktive olması ilerleyen dönemlerde, karaciğer, iskelet kası, pankreas gibi dokuları da etkilemektedir. Genişlemiş adipositlerin yanı sıra, SYA akışının artmasıyla iskelet kası, karaciğer ve pankreas gibi dokularda meydana gelen yağ dokuya makrofaj infiltrasyonu, dolaşıma proinflammatuar özellikteki moleküllerin salınımını artırmaktadır. Dolayısıyla bu dokularda insülin direnci tetiklenmektedir. Literatürde var olan çalışmalarda, obeziteyle birlikte, karaciğerde proinflammatuar gen ekspresyonlarının arttığı, iskelet kasında inflammatuar yanıtın tetiklendiği, pankreatik β -hücrelerinde ise, apoptozun indüklendiği ve insülin salınımının azaldığı gösterilmiştir (Xu, 2013), (Şekil 1.15).



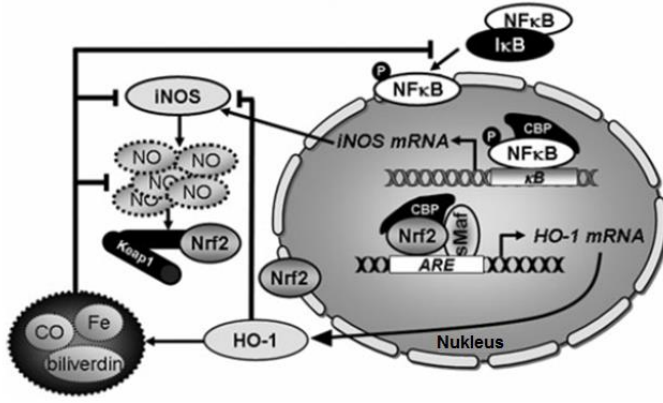
Şekil 1.15. Adipoz doku genişlemesinin immün sistem elemanları ve insülin direncine etkileri

İmmün sistemin önemli elemanları olan makrofaj hücreleri, MetS patojenezine katkıda bulunan düşük seviyeli kronik inflamatuvar yanıtın ortaya çıkışında aktif role sahiptir. Bu yanıtın ortaya çıkışına büyük oranda katkı sağlayan NF-kB, inflamasyon, apoptosis ve hücre büyümesi gibi süreçlerde rol alan genlerin regülasyonunda görev alan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu molekülün, inflamatuvar yanıtın başlamasında ve ilerlemesinde rol alan tümör nekroz faktörü a (TNF-a), indüklenbilir NOS (iNOS), interlökin-1 (IL-1), hücre içi adezyon molekülü-1 ve siklooksijenaz (COX-2) gibi inflamatuvar enzimlerin ekspresyonlarını artırdığı bilinmektedir (Hotamışlıgil, 2008). NF-kB'nin aktivasyonu inflamatuvar yanıtın gelişimini tetiklerken, hücrenin savunma mekanizmasında birtakım değişiklikler yaratmaktadır.

MetS patojenezinde yer alan insülin direnci, kronik inflamasyon ve hipertansiyon gibi durumlara büyük oranda katkı sağlayan bir diğer önemli durum oksidatif strestir. Oksidatif stresin ortaya çıkışına doğrudan etkisi bulunan reaktif oksijen ve nitrojen türleri, enzimatik oksidasyon ve mitokondriyal solunum gibi biyolojik süreçlerde doğal olarak üretilmektedir. Ancak, bu moleküllerin eliminasyon kapasitesinin azalması oksidatif strese neden olmaktadır. Glukozun enerji dönüşüm basamaklarında yer alan sitrik asit döngüsü sonucu reaktif oksijen ve nitrojen türlerini üretimi artmaktadır (Ceriello, 2000). Bu nedenle, karbonhidratların aşırı tüketimiyle gerçekleşen yüksek mitokondriyal aktivite fazla miktarda reaktif oksijen türlerinin birikimine neden olmaktadır. Bu moleküllerin zararlı etkilerine karşı, hücre kendini korumak için insülinle uyarılan glukoz alımını inhibe ederek, mitokondriye enerji girişini engellemeye çalışmaktadır. Ancak bu etki, indirek olarak iskelet kası ve adipoz dokuda insüline yanıtı azaltarak direncin gelişmesine zemin hazırlamaktadır (Ceriello ve Motz, 2004). Ayrıca, bu reaktif moleküllerin pankreatik beta hücrelerinin membran yapısını etkileyerek insülin salınımının bozulmasına neden olduğu bilinmektedir (Ceriello, 2000). MetS'de görülen hiperglisemik durumda bozulan glukoz intoleransında, glutatyon infüzyonunun ve diğer antioksidan madde uygulamasının, glukozla uyarılan insülin salınımını artırarak yanıtı güçlendirdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Paolisso ve ark., 1992).

Bahsedildiği üzere, NF-kB aracılığıyla inflamatuvar yanıtın artması, hücrede Nrf-2 (nuklear faktör 2) aracılıklı koruyucu mekanizmanın baskılanmasına neden olmaktadır. Nrf-2 normalde, oksidatif stres ya da herhangi bir indükleyicinin varlığında çekirdeğe göç ederek, bir grup detoksifikasyon ve antioksidan enziminin ekspresyonunu artıran bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf-2 ve NF-kB sinyal yolları, downstream yollarda bulunan proteinlerin transkripsiyonu veya fonksiyonunu kontrol etmek için birkaç noktada

karşı karşıya gelirler. Normalde, inflamatuvar bir uyarın varlığında hücrede NF-kB aracılığıyla inflamatuvar enzimlerden iNOS ekspresyonunun artması makrofaj hücrelerinden yüksek konsantrasyonda NO salınımına neden olmaktadır. Aynı koşullarda, NF-kB hücre için koruyucu etki sağlayan genlerin regülasyonunu sağlayan Nrf-2'nin adaptör proteinlerinden CBP'nin fosforillenmesine ya da MafK deasetilasyonuna neden olarak işlevinin engellenmesine yol açmaktadır. Ancak, inflamatuvar yanıt durumunda Nrf-2 aktivasyonunun sağlanması antioksidan özellikteki HO-1 (Hem oksijenaz 1), NQO1 (NAD(P)H quinon dehidrojenaz 1) gibi enzimlerin ve CO, Fe, biliverdin gibi moleküllerin salınımını artırarak, inflamatuvar yanıtı oluşturan unsurları (iNOS, NO, NF-kB) engelleyebilmektedir (Wakabayashi ve ark., 2010), (Şekil 1.16). Dolayısıyla, Nrf-2 aracılığıyla regülasyonu sağlanan genlerin ekspresyon seviyelerinin artması inflamatuvar yanıtı karşı koruyucu etki sağlamaktadır. Diğer yandan reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretimi, bir diğer hücresel enerji kaynağı olan yağ asitlerinin oksidasyon basamağında NADPH oksidaz uyarıldığında ve anti-oksidatif enzimlerin ekspresyonunu azaldığında da artmaktadır (Furukawa ve ark., 2017). Ayrıca, yağ dokusu oksidatif strese maruz kaldığında, anti-inflamatuvar adiponektin salınımını azaltarak, inflamatuvar adipositokin salınımını artırmaktadır (Soares ve ark., 2005). MetS patojenezinde ROS üretimi kaynaklı olarak artmış inflamatuvar sitokin düzeyleri ve azalmış adiponektin düzeyleri görülmektedir (Otani, 2011). Yanı sıra, artan ROS seviyeleri, IRS molekülleri aracılığıyla GLUT4 translokasyonunu engelleyerek insülin sinyalizasyonunda bozukluklar meydana getirerek hastalığın patojenezine katkıda bulunmaktadır (Bloch-Damti ve Bashan, 2005). Bu nedenle, özellikle KVH, tip 2 diyabet, obezite, insülin direnci gibi hastalıklarla yakından ilişkili bir durum olan ve MetS patojenezine büyük oranda katkı sağlayan düşük seviyeli kronik inflamasyon ve oksidatif stresin bahsedilen mekanizmaları üzerine engelleyici etkin ajanların ortaya çıkarılması son derece önemlidir.



Şekil 1.16. Makrofajlarda Nrf-2 ve NF-kB arasındaki koruyucu mekanizma, (Wakabayashi ve ark., 2010)

1.3. Metabolik Sendroma Karşı Kullanılan Terapötik Yaklaşımlar

Metabolik sendrom bileşenlerinin, nedenlerinin ve sonuçlarının iç içe geçtiği, birden fazla hedefe yönelik yaklaşımlarla tedavi edilebilen multifaktoriyel bir hastalıktır. MetS'li bireylerde klinik tanımlama ve tedavi süreci, birlikte gelişen hastalıkların riskini azaltmak açısından oldukça önemlidir. Dünya çapında oldukça geniş bir kitleyi etkileyen MetS patojenezini hedef alan çok sayıda yaklaşım vardır. Bu yaklaşımlar, yaşam tarzı değişiklikleri, egzersiz artırılması, diyet değişiklikleri, spesifik risk faktörlerini azaltıcı ajanların uygun şekilde kullanılması (hipoglisemik ajanlar, zayıflatıcı ajanlar, lipid düzenleyiciler), inflamatuvar yanıtın baskılanması, renin angiotensin sisteminin bloklanması olarak sıralanabilir (Fonseca, 2008). Bu yaklaşımları, farmakolojik ve farmakolojik olmayan olarak iki sınıfa ayırabiliriz. MetS'li hastalara önerilen diyet değişiklikleri, yaşam tarzı değişiklikleri, fiziksel aktivitenin artırılması, sigaranın bırakılması ve alkol tüketiminin azaltılması metabolik sendrom için riski azaltan farmakolojik olmayan yaklaşımlardır ve tedavide önemli rol oynamaktadırlar (O'Keefe ve ark., 2008; Onat, 2011). Yanı sıra, enerji kısıtlaması, beslenmedeki makro besin kompozisyonu, fonksiyonel gıdalar ve biyoaktif besinlerin de MetS ile ilgili risk faktörlerini önemli ölçüde iyileştirdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Yamaoka ve Tango, 2012; Feldeisen ve Tucker, 2007). Bu yaklaşımların benimsenmesi, glisemik kontrol müdahalesinde, insülin etkisinin iyileştirilmesinde, kan basıncının düzenlenmesinde, lipid seviyelerinin kontrol edilerek obezite gelişiminin engellenmesinde oldukça önemlidir. Özellikle yaşam tarzı değişikliği, MetS tedavisi için en önemli müdahale olarak düşünülebilir. Diyabet Önleme Programı, yaşam tarzı değişikliğinin MetS gelişimini plaseboya kıyasla % 41 oranında azalttığını göstermiştir (Orchard ve ark., 2005). Sağlıklı, az yağlı, sebze ve tahılları içeren bir diyet ve

haftada en az 150 dakika fiziksel aktiviteyi kapsayan bir yaşam tarzı değişikliğinin, vücut ağırlığının azalmasında % 7'lik bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Grundy ve ark., 2005). MetS patojenezinde yer alan aterojenik yağ birikiminin ve bel çevresi obezitesinin fiziksel aktivite ile ilişkili şekilde yüksek oranda azalması yaşam tarzı değişikliklerinin MetS tedavisinde oldukça önemli bir role sahip olduğunu açıkça göstermektedir (Fonseca, 2008).

MetS'yi tedavisinde farmakolojik olmayan yaklaşımlarla tedavi sürecini sürdüremeyen hastalar yoğunlukla farmakolojik ajanlara yönlendirilmektedir. MetS'ye patojenezinde tek bir mekanizma bulunmadığından, bu hastalığa sahip bireylerde hastalığın ortaya çıkışına neden olan patofizyolojik durumların tanımlanması, uzun süre takip edilmesi ve bireysel tedavilerin önerilmesi gerekmektedir. Temelde insülin direnci zemininde gelişen MetS'ye karşı klinikte kullanılan iyileştirici ve önleyici etki sağlayan multihedef tek bir farmakolojik ajan yoktur. Bu yüzden MetS komponentleri ayrı ayrı tedavi etmeye çalışılmakta ve özellikle öne çıkan olguları tek tek hedef alan farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır (Nammi ve ark., 2009). Tedavide ilk olarak metabolik sendrom prediyabetik bir durum olarak kabul edilir, bunun nedeni hastalığın insülin direnci temelinde gelişmesidir (Cefalu ve ark., 2008). MetS tedavisi başlangıcında, bahsedildiği üzere insülin direnci kaynaklı ortaya çıkan hiperglisemiye karşı öncelikle metformin kullanılır; sonrasında PPAR- γ agonisti veya insülin hassasiyetini artırıcı bir ajan tedaviye dahil edilmektedir. Bir başka önemli MetS komponenti dislipidemiye karşı ise, statinler tedaviye eklenmektedir. Ayrıca, kronik inflamatuvar durumların tersine çevrilmesi ve aynı zamanda kan pıhtılaşması, kalp krizi riskinin azaltılması için aspirinin günlük olarak kullanılması önerilmektedir. Obezitenin de görüldüğü bireylerde tedaviye orlisat ve lorcaserin ilaçları da dahil edilebilmektedir (Richelsen ve ark., 2007; Smith ve ark., 2010; Marvasti and Adeli, 2010). Ne yazık ki bu yaklaşımlar hastaları uzun yıllar veya kimi zaman ömür boyu çok sayıda ve çok çeşitli ilaç kullanımına mahkum etmektedir. Buda ilerleyen süreçte, karaciğer toksitesi, böbrek hasarı gibi ağır yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Lender ve Sysko, 2006). MetS tedavisinde çok sayıda ilacın bir arada kullanılmasına rağmen, hastalığın ileri ve kontrol edilemeyen safhalarında veya önlenmesinde her üç hastadan biri, birden fazla MetS komponentinde iyileştirici etkiye ve daha az yan etkiye sahip olması nedeniyle en az bir çeşit geleneksel bitkisel ilaç kullanmayı da tercih etmektedir. Bu nedenle MetS komponentlerinin tümünü hedef alan bitkisel kökenli doğal geleneksel yaklaşımların araştırılması, ortaya konulması ve daha az yan etkiye sahip multi-hedef etken maddelerin tespit edilmesi son derece önemlidir.

1.4. Metabolik Sendrom Tedavisinde Bitkisel Terapötiklerin Önemi

Önceki bölümde bahsedilen terapötik yaklaşımların yan etki ve sınırlılıklarından dolayı tedavide kullanılabilecek yeni stratejilerin araştırılmasına ve geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Tek hedefi olan sentetik ilaçların aksine, metabolik sendrom bileşenlerinin ve bunlarla ilişkili diğer metabolik bozuklukların eşzamanlı olarak iyileştirilmesinde multihedef doğal bileşiklerin ortaya çıkarılması önem arz etmektedir. Bu noktada, binlerce yıldır tüm dünyada kullanılan tıbbi bitkiler, çeşitli metabolik etkilere sahip fitokimyasalları ve biyoaktif bileşiklerin geniş bir aralığını içerdiği için MetS tedavisinde mükemmel bir kaynak olarak düşünülmektedir. Bitkilerin içerdiği biyoaktif doğal bileşenlerin sinerjistik etkiye sahip olmaları, multihedef olmaları, tek bir kimyasalın etkisinden daha fazla fayda sağlamaları, az yan etkiye sahip olmaları, multifaktöriyel bir hastalık olan MetS için umut verici terapilerin ortaya çıkarılmasında önem taşımaktadır (Graf ve ark., 2010). Bitkisel ilaçlar sentetik olanlarla karşılaştırıldığında, çok daha az toksik ve yan etkiye sahip olmasının yanı sıra birçok metabolik süreci yönetebilmelerinden dolayı büyük avantaj sağlamaktadır. Ancak, bitkisel tedavinin modern tıbbi tedaviler ile bütünleştirilmesindeki en büyük engel, bitkisel ajanların güvenilirlikleri ve etkilerinin ortaya koyulduğu klinik ve bilimsel veri eksikliğidir. Bu nedenle, bitkisel tedavide tercih edilen bu doğal kaynakların biyolojik standardizasyonlarının, farmakolojik ve toksikolojik değerlendirmelerinin uygun biyoassayler kullanılarak *in vivo*, *in vitro* ve klinik araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu araştırmalar sonucu ortaya çıkarılan veriler, güvenli alternatif ilaç ve stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayıcı olması açısından önemlidir (Gunjan ve ark., 2011). Halk arasında farklı şekillerde kullanılan pek çok bitkinin, terapötik preparatlar şeklinde standardize edilmesini sağlamak için, bitkilerin içerisindeki aktif bileşenlerin karakterizasyonu, bunların toksisitesinin değerlendirilmesi, etki mekanizmalarının bilimsel araştırmalarla ortaya çıkarılması gerekmektedir (Graf ve ark., 2010).

Hem geleneksel hem de modern sağlık sistemlerinde kullanılan tıbbi bitkiler, günümüzde piyasada karşımıza çıkan farmasötik ürünlerin % 25' inden fazlasının kaynağını oluşturmaktadır (Newman ve ark., 2003). 1981-2006 yılları arasında ABD tarafından onaylanan ilaçların % 70' i doğal moleküller üzerine yapılmış çalışmaların sonucunda piyasaya çıkmıştır (Liu ve Wang, 2008). Metformin, yarım yüzyılı aşkın bir süredir diyabet tedavisinde dünya çapında yaygın olarak kullanılan doğal kaynaklı bir terapötiktir. 1900' lü yılların başlarında *Galega officinalis* bitkisinden izole edilen guanidin molekülünün diyabet modellerinde glukozüri'yi iyileştirdiği Watanabe (1918) tarafından gösterilirken, 1957 yılında, guanidin molekülünün yapısal olarak modifiye bir türevi olan

Metformin (bir çeşit biguanidin) Bristol Myers Squibb firması patenti altında piyasaya sürülmüştür. Bu ilaç, akarboz ve thiazolidinedion türevi sentetik diyabet ilaçlarıyla karşılaştırıldığında son derece başarılıdır ve yan etkilerinin düşük olması sebebiyle bunlara ciddi anlamda üstünlük sağlamıştır (Haddad ve ark., 2012). Literatürde geleneksel tedavide kullanılan 400'den fazla bitki türünün antidiyabetik aktivitesi olduğu bilinmektedir (Pareek ve ark., 2009). Ancak, küçük bir kısmının terapötik potansiyeli ile ilgili bilimsel ve tıbbi değerlendirmesi yapılmıştır. Ülkemizde de tip 2 diyabet tedavisinde yaygın şekilde kullanılan bitkileri, *Trigonella foenum-graecum* (çemen), *Cinnamomum zeylanicum* (tarçın), *Allium cepa* (soğan), *Allium sativum* (sarımsak), *Nigella sativa L.* (çörek otu), *Morus nigra L.* (karadut), *Olea europaea L.* (zeytin), *Glycine max L.* (soya fasülyesi), *Vaccinium myrtillus L.* (yaban mersini), *Cuminum cyminum L.* (kimyon), *Foeniculum vulgare Miller* (rezene), *Secale cereale L.* (çavdar), *Ocimum sanctum L.* (fesleğen), *Helianthus tuberosus L.* (Yer elması), *Allium porrum L.* (pırasa), *Cydonia oblonga Miller* (ayva), *Urtica dioica L.* (ısrırgan), *Punica granatum L.* (nar), *Hibiscus sabdariffa L.* (bamyacı çiçeği), *Teucrium polium L.* (Kısamahmut otu) şeklinde sıralayabiliriz (Çıkladilmez, 2013). Bu bitkiler antidiyabetik potansiyellerini sahip oldukları flavonoid, alkaloid, izoflavon, flavonol, glikozit, terpenoid gibi etkili antidiyabetik bileşenler sayesinde ortaya koymaktadır. Halk tarafından yaygın şekilde kullanılan bu bitkilerin insülin hassasiyetini artırıcı, glukoz emilimini geciktirici, peripherel hücrelerde glukoz kullanımını artırıcı, glikojen sentezini uyarıcı gibi etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Çıkladilmez, 2013). Bu bitkilerin preparat şeklinde hazırlanmış formları eczane ve aktarlarda satılmaktadır. Bunların birçoğunun, diyabetik komplikasyonların yanı sıra, hipertansiyon ve hiperkolesterolemi de dahil olmak üzere metabolik sendrom ile ilişkili diğer risk faktörlerini de hedef alabileceği düşünülmektedir (Graf ve ark., 2010).

Metformin örneğindeki gibi bitkiler 5000 yılı aşkın bir süredir sayısız terapötik ajanın kaynağı olmuştur. 1940' lı yıllardan 2014' ün sonuna kadar kanser tedavisi için onaylanan 175 küçük molekülün 85 (% 49) tanesinin ya doğrudan doğal ürünlerden izole edilmiş bileşikler ya da bunlardan dolaylı olarak türetilmiş moleküller olduğu bilinmektedir (Newman ve Cragg, 2016). Son zamanlarda, metabolik sendromun bileşenlerine karşı tedavi edici ve önleyici etkinliğe sahip moleküllerin keşfi ve ilaç etken maddesi olarak geliştirilmesi üzerine yoğun çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmaların büyük bir kısmı halk arasında T2D ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde uzun yıllardan beri geleneksel olarak kullanılmakta olan bitkilerden yola çıkarak tasarlanmıştır. Örneğin, *Coptis chinensis* bitkisinden izole edilen berberin alkaloidinin ve türevlerinin kan

şekerini düşürmede oldukça etkili olduğu, iskelet kası ve adipoz dokuda GLUT4 glukoz taşıyıcı proteinin hücre membranına translokasyonunu artırarak ve glikolizi indüklediği bildirilmiştir (Yin ve ark., 2008). Diğer çalışmalarda, berberin ve türevlerinin ayrıca serum trigliserit konsantrasyonunu % 36, total kolesterol konsantrasyonunu % 18 ve LDL-kolesterol miktarını % 21 azalttığı (Kong ve ark., 2004), pankreatik beta hücrelerinin kitlesinde de artışa neden olarak bu hücrelerin glukoz cevabını artırdığı gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2008). Dolayısıyla, berberinin hem lipid hem de glukoz metabolizması üzerindeki iyileştirici etkileri sayesinde MetS tedavisi için umut vaat edici doğal bir ajan olduğu düşünülmektedir (Xia ve Weng, 2010). Başka bir çalışmada, *Mamordica Charantia*, *Gymnema sylwestre* ve *Irvingia Gabonensis* bitkilerinin glikoz ve lipid homeostazı, obezite ve MetS üzerindeki etkileri, *in vitro* ve hayvan modellerinde olduğu kadar diyet takviyeleri için tasarlanmış insan klinik deneylerinde de geçerlilik kazanmıştır (Martínez-Abundis ve ark., 2016). Yanı sıra, bu konu ile ilgili olarak geniş kapsamlı çalışmalar da yürütülmektedir. Metabolik sendromun tedavisinde etkili ve ümit vadeden doğal ajanların keşfi ve geleneksel Çin ilaçlarının modernizasyonunu konu alan Herbalome projesi bunun en güzel örneğidir (Xia ve Weng, 2010). Bir diğer örnek ise, Kanada'dan oldukça geniş bir grubun yürüttüğü, Kanada da yaşayan yerli aborjinlerin potansiyel antidiyabetik bitkilerini araştırdıkları kapsamlı çalışmadır (Haddad ve ark., 2012).

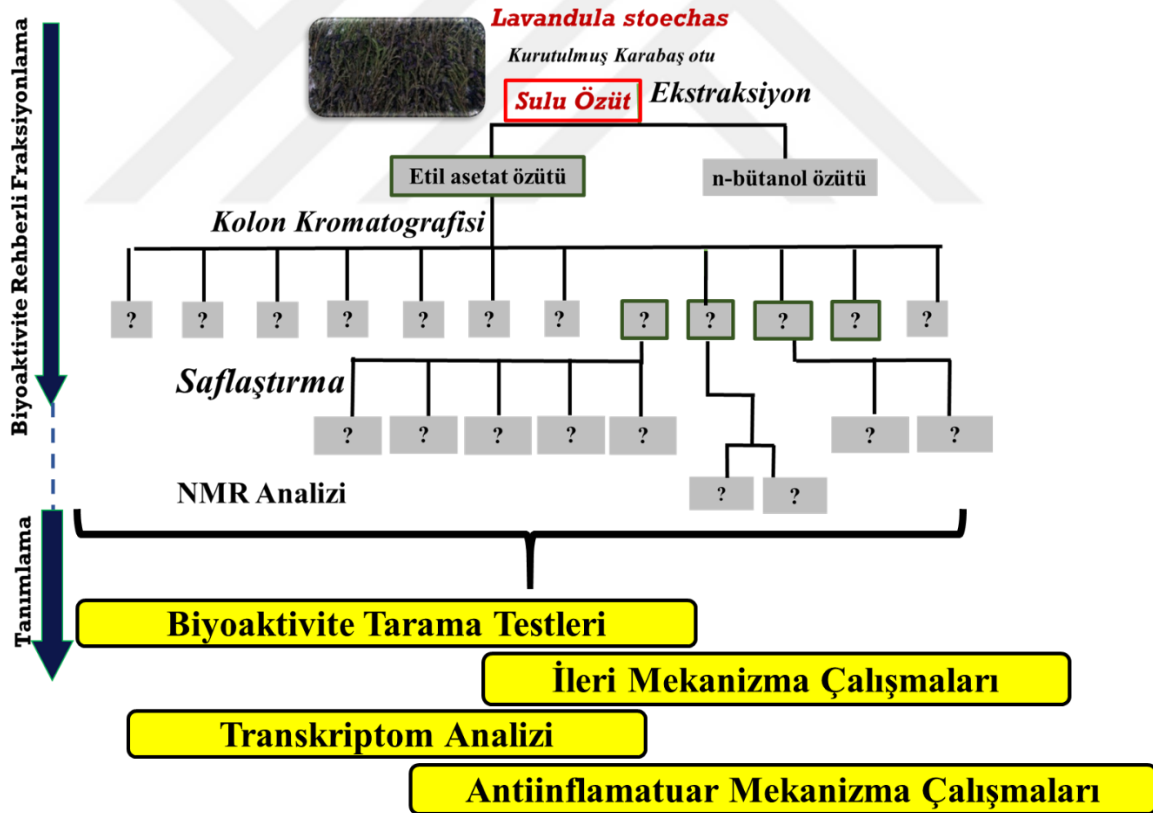
1.5 Çalışmanın Amacı

21. yy teknolojisinin sağlık sektörüne getirdiği pek çok yeniliğe rağmen, modern çağın en önemli sorunlarından biri olan metabolik sendromun tedavisinde kullanılabilecek etkin, güvenilir ve en önemlisi multi-hedef bir farmakolojik ajan bulunmamaktadır. Tedavi amaçlı olarak hastaların büyük bir çoğunluğunda, metabolik sendromun ölümcül dörtlü olarak anılan “insülin direnci, dislipidemi, obezite ve tansiyon” bileşenlerini tek tek hedef alan farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır. Ne yazık ki bu yaklaşım hastaları uzun yıllar, kimi zaman ömür boyu çok sayıda ve çok çeşitli ilaç kullanımına mahkum etmektedir. Sonuç olarak ilerleyen süreçte, kronik karaciğer ve böbrek hasarı gibi ciddi yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle metabolik sendromun ana unsurlarından olan insülin direnci ve dislipideminin her ikisini birden hedef alan bitkisel kökenli doğal geleneksel yaklaşımların araştırılması ve daha az yan etkiye sahip multi-hedef etken moleküllerin tespit edilerek geliştirilmesi hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde son derece önemlidir.

Lavandula stoechas-Karabaş otu bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen dekoksiyon ya da infüzyonu, ülkemizde özellikle Marmara ve Ege bölgesinde halk

arasındaki tabiriyle kalp ve damar hastalıklarında “damar açıcı ve kalbi güçlendirici”, “zayıflatıcı”, şeker hastalığında, yüksek tansiyonda ve yüksek kolesterolde “iyileştirici” olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Tüm bu kullanım alanları metabolik sendromun ölümcül dörtlü olarak adlandırılan bileşenlerini ve ilerleyen aşamalarında gelişen metabolik bozuklukları işaret etmektedir. Buradan yola çıkarak, tez çalışması kapsamında ülkemizde geleneksel tedavi amaçlı yaygın bir şekilde kullanılan Karabaş otu sulu ekstresinin fitokimyasal bileşenleri tanımlanmış, bu moleküller arasından insülin direnci ve dislipidemideyi karşı etken moleküller tespit edilerek bunların etki mekanizmaları moleküler ve fizyolojik olarak aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu çalışmayla, metabolik sendromu oluşturan ana faktörlere karşı önleyici ve tedavi edici, etken madde olarak geliştirilmeye “aday” bitki fraksiyonları ve moleküllerin tespit edilmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla çalışma kapsamında izlenen yöntem ve yaklaşımlar Şekil 1.17’ de özetlenmiş ve aşağıda aşamalarıyla sıralanmıştır.



Şekil 1.17. Karabaş otu sulu özütünün içeriğindeki aktif bileşenlerin biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yöntemiyle tanımlanması

Çalışmanın ilk aşamasında,

- 1) Karabaş otunun toprak üstü kısımları uygun koşullarda kurutulmuş ve toz haline getirildikten sonra sulu kaynatma yöntemiyle özüt hazırlanmıştır.
 - 2) Elde edilen sulu özüt n-bütanol ve etil asetat çözücüleri kullanılarak ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur.
 - 3) Elde edilen ekstratların sitotoksik olmayan güvenli uygulama dozlarını belirlemek amacıyla farklı dozlar kullanılarak, tüm hücre hatlarında MTT testi gerçekleştirilmiştir.
 - 4) H4IIE sıçan hepatokarsinoma hücre hattı ile farklılaştırılmasını yaptığımız C2C12 fare iskelet kası ve 3T3-L1 fare adiposit hücre hatlarında kapsamlı optimizasyon çalışmaları ile deneysel insülin direnci modeli oluşturulmuştur.
 - 5) En aktif olan ekstratı seçebilmek amacıyla, biyoaktivite rehberli tarama yaklaşımı kullanılarak, ekstratların insülin direnci ve dislipideminin patolojik mekanizmaları üzerine potansiyel iyileştirici etkileri;
 - a) Fizyolojik boyutta: elde edilen ekstratların çalışılan hücre hatlarında glukoneojenik glukoz üretimi, glukoz tüketimi, glukoz alımı, gliserol salınımı gibi fizyolojik parametreler üzerine etkileri tespit edilerek,
 - b) Moleküler boyutta: elde edilen ekstratların; serbest yağ asidi ile insülin direnci geliştirdiğimiz H4IIE ve C2C12 hücre hatlarında insülin sinyalizasyonunda önemli rolü olan genlerin protein seviyeleri (p-AKTSer473/AKT oranına, GLUT-4, LPL, GLUT2, IR β ve PPAR- γ , p-IRS1Ser307) üzerine etkileri tespit edilerek belirlenmiştir.
- Ayrıca, karaciğer hücre hattında, glukoneojenik glukoz üretiminde baskılayıcı role sahip ekstratın bunu hangi mekanizmaları kullanarak gerçekleştirdiğini aydınlatmak için bu yolağın hız sınırlayıcı enzimleri olan PEPCK ve G6Paz'ın ekspresyon seviyeleri de belirlenmiştir.

Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda, **EE'nin** yüksek etkinlik gösterdiği belirlenmiş, bu nedenle **“aktif ekstrat”** olarak seçilmiştir. Çalışmalara EE'nin biyoaktivite rehberli fraksiyonlanması ile devam edilmiştir (Şekil 1.17)

Çalışmanın ikinci aşamasında, seçilen aktif ekstratın içerik aydınlatma çalışmaları ile beraber fraksiyonlama çalışmaları tamamlanmıştır. E1-E12 olarak adlandırılan EE alt fraksiyonlarının etkinlikleri **beş** ayrı parametre (1-5) kullanılarak, kontrollü ve tekrarlı deneylerle taranıp ve değerlendirilmiştir.

Bu aşamada gerçekleştirilen biyoaktivite rehberli tarama çalışmaları;

- 1) H4IIE hücrelerinde glukoneojenik glukoz üretimindeki değişimler,
- 2-3) Glukoneojenez yolağında hız sınırlayıcı olarak görev alan regülatör PEPCK ve G6Paz

enzimlerinin gen ekspresyon seviyesindeki değişimler,

4) Serbest yağ asidi (palmitik asit) uygulaması ile insülin direnci geliştirmeyi başardığımız C2C12 hücrelerinde, insülin sinyalizasyonunda fosforillenmeyle pek çok yolağın kontrolünü sağlayan AKT proteinin p-AKT/AKT oranlarındaki değişimler (Western Blot analizleri ile),

5) İnsülin direnci oluşturulan C2C12 hücrelerinde lipit metabolizmasında önemli rol oynayan lipoprotein lipaz (LPL) enziminin protein seviyesindeki (Western Blot) değişimlerin değerlendirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada yapılan tüm bu çalışmaların değerlendirilmesi sonucu, EE fraksiyonlarından en etkin alt fraksiyonlar seçilmiş, seçilen bu fraksiyonların içerik aydınlatma çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmanın üçüncü aşamasında, Karabaş otu sulu demlemesinden elde edilen etil asetat ekstratının tüm alt fraksiyonları için yapı aydınlatma ve saflaştırma çalışmaları tamamlanarak, içeriğindeki bileşikler tanımlanmıştır (şekil 1.17). Sonrasında, metabolik sendrom ve komponentlerine karşı kullanılabilcek en etkin aday moleküllerin ortaya çıkarılması için çalışmalara devam edilmiştir.

Diğer fraksiyonlara göre daha aktif olduğu tespit edilen 4 fraksiyondan (E8, E9, E10, E11) kromatografik yöntemler kullanılarak saflaştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Saf olarak elde edilen fitokimyasallardan en etkin moleküllerin tespit edilmesi amacıyla tekrar tarama testleri yapılmıştır. Buna göre moleküller, yukarıdaki tüm çalışmalar sonucunda en önemli belirleyici ölçüt olduğunu düşündüğümüz H4IIE hücrelerinde glukoneojenik glukoz üretiminin ölçümü, PEPCK ve G6Paz enzimlerinin gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler kullanılarak taranmıştır. Bu genel tarama testlerinden elde edilen sonuçlara göre bazı moleküller elenmiş, kalan moleküller ile ileri mekanizma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Etkin olduğu belirlenen saf moleküllerin;

1) İnsülin direnci geliştirilen H4IIE hücrelerinde p-AKTSer473/AKT, LPL proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde yarattığı değişimler,

2) İnsülin direnci geliştirilen C2C12 hücrelerinde p-AKTSer473/AKT, IR-β, PPAR-γ proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde yarattığı değişimler,

3) 3T3L1 hücre hattında gliserol salınımı üzerine etkileri,

4) BTC-6 beta pankreatik hücrelerinde insülin salınımı üzerine etkileri, GLUT2 protein seviyesi ve glukokinaz enziminin mRNA ekspresyon seviyesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında ise, yukarıda ele alınan tüm parametreler değerlendirildiğinde insülin direnci ve dislipidemiye karşı en etkin olduğunu

düşündüğümüz moleküllerin ve aktif ana ekstratın karaciğer hücre hattı transkriptomu üzerine etkileri belirlenmiştir. Ayrıca, çalışma kapsamında ilk defa izole edilen Kafeoyl rosmarinik asit bileşiğinin kronik inflamasyona karşı koruyucu mekanizması ve antioksidan enzimlerin mRNA seviyeleri üzerine etkileri gen sessizleştirme yöntemi kullanılarak aydınlatılmıştır.

Bütün bu verilerin ışığında, ülkemizde alternatif ve tamamlayıcı tedavide yaygın olarak kullanılan Karabaş otunun sulu demlemesi EE içeriğindeki bileşenler ilk defa tanımlanmış, bu bileşenlerin insülin direnci ve dislipidemiye karşı potansiyel iyileştirici etkisi ve moleküler mekanizmaları ilk defa aydınlatılmıştır. Metabolik sendromu oluşturan unsurların tedavisinde kullanılmak üzere yan etkisi düşük multi-hedef doğal bitkisel ajanların etkilerinin aydınlatılması, tedavide kullanılabilecek etkin gıda takviyelerinin ve ilaç ham maddelerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tez çalışması kapsamında yapılan literatür taramalarında, *Lavandula stoechas* bitkisinin biyolojik aktivitelerinin gösterildiği çalışmaların büyük bir kısmında uçucu yağın etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda, i) *Lavandula stoechas* esansiyel yağının güçlü şekilde antibakteriyel aktivite gösterdiği (Dadaloğlu ve Evrendilek, 2004), ii) bitkinin yaprak kök ve gövdesinden elde edilen esansiyel yağının antifungal aktivitesinin olduğu (Angioni ve ark., 2006), iii) *Lavandula stoechas* esansiyel yağının antiinflamatuvar ve antifungal aktivitelerinin olduğu rapor edilmiştir (Zuzarte ve ark., 2013). Ayrıca, *Lavandula stoechas* bitkisi esansiyel yağının antidiyabetik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur. Sebai ve ark.'larının (2013, 2015) gerçekleştirdikleri iki çalışmada, alloxan ile diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda *Lavandula stoechas* esansiyel yağının uygulamasının kan glukoz seviyesini dengelediği ve antioksidant enzimlerin seviyesini artırdığı gösterilmiştir. Karabaş otundan elde edilen uçucu yağın bileşenleri ve etkileri üzerine çok geniş bir literatür bilgisi olmasına rağmen (Cavanagh and Wilkinson, 2002; Chu and Kemper, 2001), sulu bileşenleri üzerine bilgiler son derece sınırlıdır. Bu bitkinin sulu bileşen polifenol içeriği tam olarak tanımlanmamıştır. Literatürde, içeriğinde flavon 7-glikozitler özellikle de, apigenin ve luteolin 7-O-glukozitlerin bulunduğunu gösteren sadece bir çalışma mevcuttur (Upson ve ark., 2000). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise, luteolinin karaciğer ve yağ dokusu aracılığıyla, insülin duyarlılığını geliştirdiği ve diyetle indüklenen obezitenin zararlı etkilerini iyileştirdiği gösterilmiştir (Kwon ve ark., 2015). Yapılan başka bir çalışmada, bitkinin sulu bileşenlerinden apigeninin, yüksek yağlı diyetle indüklenen obez farelerde pro-inflamatuvar moleküllerin plazma seviyelerini ve açlık kan şekeri seviyesini düşürdüğü rapor edilmiştir. Bu çalışmada, apigeninin anti-hiperglisemik etkisini, insülin direnci, hiperinsülinemi ve glukoneojenik enzim aktivitelerini baskılayarak ortaya koyduğu gösterilmiştir (Jung ve ark., 2016).

Anadolu'da yapılan etnobotanik çalışmaların önemli bir kısmı, esansiyel yağdan ziyade, *Lavandula stoechas* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan çayın MetS ile ilişkili kalp hastalığı, yüksek kolesterol, ateroskleroz, hiperglisemi, şeker hastalığı, hipertansiyon ve obezite gibi metabolik bozuklukların tedavisinde geleneksel olarak kullanıldığını göstermiştir (Abay ve Kılıç, 2001; Bulut, 2006; Tuzlacı ve Aymaz, 2001; 2001; Uğulu ve ark., 2009). Bu bitkinin sulu ekstratının halk arasında MetS ile ilişkili

çeşitli patolojik koşullara karşı etkili bir şekilde kullanılmasına rağmen, yapılan literatür taramalarında sulu ekstratı ile herhangi bir biyoaktivite çalışmasıyla karşılaşılmemiştir. Bu nedenle tez çalışmasında, *L. stoechas* sulu ekstraktının, fenolik bileşenleri tanımlanarak, *in vitro* hücre tabanlı biyoassayler kullanılarak potansiyel iyileştirici etkileri ve moleküler mekanizmaları aydınlatılmıştır.



BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar

Yüksek glukoz içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (D6429), Düşük glukoz içeren DMEM (D5546), glukoz içermeyen DMEM (D5030), 8-CTP-AMP 8-(4-Klorofeniltio) adenozin 3',5'-siklik monofosfat sodyum tuzu (C3912), gallik asit (G7384), 3-Izobutil-1-metilksantin (IBMX; I5879), MTT [3-(4, 5-dimetil-2-thiazolil)-2, 5-difeniltetrazolyum bromid] (M5655), sodyum piruvat (P5280), sodyum laktat (L7022), human insülin (91077C), metformin (PHR1084), bovine insülin (I0516), serbest yağ asidi içermeyen BSA (sığır serum albumin; A6003), metanol (24229), tripan blue solüsyonu (T8154), sülfürik asit (07208), dimetil sülfoksit (DMSO; D2650), sodium palmitat (P9767), N, N-metilenbisakrilamid (M7256), lipopolisakkarit (LPS; E.coli 0111:B4 L4391) Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, USA) marka satın alınmıştır.

PureLink® RNA mini kit (12183018A), TRIzol® (15596018), tripsin-EDTA (25200056), cDNA sentez kiti (4368814), DNaz I (AM2222), TaqMan® PCR Master Mix (4369016), TaqMan® Probe PEPCK, TaqMan® Probe G6Paz, TaqMan® Probe β -aktin, TaqMan® Probe Nrf-2, TaqMan® Probe iNOS, TaqMan® Probe HO-1, TaqMan® Probe NQO1, Microamp Fast Optical 96 Well plate (4346906), Microamp Optical Adhesive Film (4360954), fetal sığır serum (FBS, 10270106), penisilin-streptomisin (15140122), Lipofectamine™ 2000 Transfeksiyon Reaktifi (11668027), Opti-MEM (31985-070), pre-designed Silencer® Nrf-2 siRNA (4390771), silencer® Select Negatif Kontrol siRNA (4390843) Life Technologies, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA) marka satın alınmıştır.

Glukokinaz ve β -aktin primerleri Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA) marka satın alınmıştır.

ECL Western blotting luminol solüsyonu (sc-2048), dimetil sülfoksit (DMSO; sc-358801), yağsız süt tozu (sc-2324), bikinkoninik asit protein assay kit (BCA; Intron Bio 21071), primer antikorlar; anti-insülin reseptör β (IR- β , sc-711), anti- glukoz transporter 2 (GLUT2; sc-9117), anti fosfo-protein kinaz B (p-AKTSer473; sc-7985), anti- protein kinaz B (AKT; sc-5298), anti-lipoprotein lipaz (LPL; sc-32885), anti peroksizom proliferator-aktive edilmiş reseptör- γ (PPAR- γ ; sc-7196), anti fosfo-insülin reseptör substrat-1 (p-IRS-1 Ser307; sc-33956), anti glukoz transporter-4 (GLUT-4; sc-53566), sekonder antikorlar;

goat anti rabbit (sc-2030), goat anti mouse (sc-2031), dankey anti goat (sc-2020) Santa Cruz Biotechnology (Bergheimer, Heidelberg, Germany) marka satın alınmıştır.

BSA fraksiyon V (ALB002), sodyum dodesil sülfat (SDS; SDS001), tris (2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (TRS001), tween-20 (TWN510.500), triton X-100 (TRX777), glisin (GLN001), BioShop Canada (Mainway, Burlington, Ontario) marka satın alınmıştır.

Dötero DMSO (d₆- M103424.0100), metanol (106009.2500), dötero metanol (d₄- M106028.0100), formik asit (M100263.2500), sodyum karbonat (Na₂CO₃; 106392), potasyum klorür (KCl; 104936), gliserol (104093), kloroform (102431), folin fenol reaktifi (109001), hidroklorik asit (HCl; 1003142), 2-propanol (100995), sodyum klorür (NaCl; 106404), sodyum hidroksit (NaOH; 106462), kloroform (102445.2500), potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄; 104873), aseton (100013.2500), dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄; 105101), TLC silika jel60 (GF₂₅₄) E. Merck (Darmstadt, Germany) marka satın alınmıştır.

Redisep-Gold flash kromatografisi kolonları (40 gram, Ters faz C18 kolonları-Katalog No: 69-2203-413), amonyum persülfat (APS; A1142), Tetrametil-etilen-diamin (TEMED; A1148) Applichem (Ottoweg, Darmstadt, Germany) marka satın alınmıştır.

Bisakrilamid (O172), akrilamid (O341) Amresco Biochemicals (Parkway Cleveland, OH, ABD) markasından satın alınmıştır. Deksametazon (1042), glukoz assay kit (K606), glukoz alım kiti (K676), lipoliz kiti (K577), BioVision Incorporated (Headquarters, Milpitas, California) marka satın alınmıştır.

ELISA fare insülin salınım kiti RayBiotech (Norcross, Georgia, ABD) marka satın alınmıştır.

Diğer gerekli maddeler yüksek saflık derecesine sahip, deneylerde kullanılabilir düzeydedir.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında dikey elektroforez sistemi (BioRad), elektroblotter (Thermo Fisher Scientific), Step One Plus® Real-Time PCR sistemi (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), Esco cell culture CO₂ inkübatör, Nordicsafe Esco sentirel Gold (Class II BSC), BioSan TS-100 ısıtıcılı çalkalayıcı, soğutmali santrifüj (Hettich Zentrifugen Mikro 200R, Hettich Zentrifugen Universal 320), Hanna Instruments HI2211 pH metre, C-DiGit® Blot Scanner-LI-COR Biosciences, Major-Science (MS) Waver Shaker, HPLC-TOF/MS (Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC System), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR-

Marka: Agilent 600 MHz, model: 600/54 ASC-premium compact), flash kromatografisi (Combi Flash Rf-TELEDYNE ISCO), NanoQuant (Tecan Infinite® M200 PRO) cihazları kullanılmıştır.

3.1.3 Karabaş Otunun Temini ve Teşhisi

Çalışmada kullanılan Karabaş otu 2014 yılı Nisan ayında Çanakkale ili Bayramiç ilçesinin Palamutoba köyünden 39° 52' 55.22" K, 26° 32' 59.53" D ve 256 m rakımdan taze olarak toplamıştır. Bitkinin teşhisi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Ersin Karabacak tarafından gerçekleştirilmiş ve kurutulmuş bir örnek Çanakkale Botanik Bahçesi Herbaryumu (CBB)'da 000 937 kayıt numarası ile korumaya alınmıştır. Toplanan bitkiler ışık almayan, serin ve kuru bir ortamda kurutularak ekstraksiyon işlemleri için hazır hale getirilmiştir.

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

Tez çalışmasında kullandığımız C2C12 (ATCC® CRL-1772™), H4IIE (ATCC® CRL-1548™), 3T3L1 (ATCC® CL-173™), RAW264.7 (ATCC® TIB-71™) ve BTC-6 (ATCC® CRL-11506™) hücre hatları ATCC (American Type Culture Collection) marka olup, ilk dört hücre hattı Prof. Dr. İlya Raskin (Department of Plant Biology and Pathology, Rutgers University, New Jersey, USA) tarafından laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda kullanılmak üzere hediye edilmiştir. BTC-6 hücre hattı, Pamukkale Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Alaattin Şen tarafından laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda kullanılmak üzere hediye edilmiştir.

3.2. Yöntem

Tez çalışması kapsamında kullanılacak sarf malzeme ve bitki materyalinin temin edilmesinin ardından kurutulmuş Karabaş otunun sulu demlemesi hazırlanarak, aşağıda detayları verildiği üzere etil asetat ve n-bütanol ekstratları elde edilmiştir. Ekstratların elde edilmesinin ardından total polifenol miktarları tayin edilmiştir. Ekstratlar, fraksiyonlar ve saf maddelerin hücre hatlarına uygulanacak güvenli dozlarını belirlemek için, tüm hücre hatlarında MTT testi yapılarak hücre canlılığı tespit edilmiştir. Temin edilen hücre hatlarının (H4IIE, C2C12, 3T3L1, RAW264.7, BTC-6) laboratuvar ortamına adaptasyonu sağlanmış, büyümeleri ve pasajlanmaları yapılarak çalışma süresince yetecek miktarda sıvı azot tankında stoklar oluşturulmuştur. Ayrıca, C2C12 miyoblast hücrelerinin miyotüp hücrelerine farklılaşması için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Aynı şekilde 3T3L1

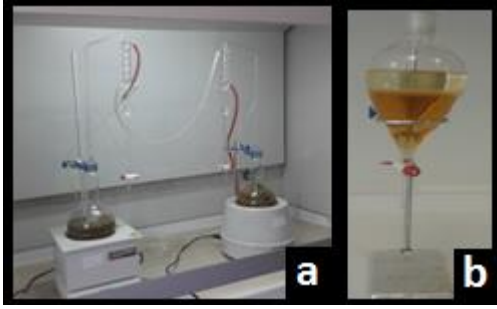
hücrelerinin farklılaşması için de optimizasyon çalışmaları yapılmış ve Oil red boyama ile doğrulanmıştır. Sonrasında, hücre tabanlı biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yöntemi kullanılarak ekstrat/fraksiyon/saf bileşikler ile insülin direnci ve dislipidemiye karşı etkinlik ve tarama çalışmaları aşağıda detayları verildiği üzere gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Karabaş Otundan Farklı Çözücülerle Ekstratların Hazırlanması, Fraksiyonlanması, Saflaştırma ve İçerik Aydınlatma Analizleri

Karabaş otunun çeşitli çözücüler ile ekstratlarının hazırlanması, ekstratların fraksiyonlanması, fraksiyonların içeriğindeki moleküllerin saflaştırılması ve bu moleküllerin yapı analizleri, 112T442 no'lu TUBİTAK projesi kapsamında Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. İbrahim Demirtaş ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Kimyasal analizlerin gerçekleştirilmesinde kullanılan yöntemlere Bölüm 3.2.1.1- 3.2.1.7'de ayrıntılarıyla yer verilmiştir.

3.2.1.1. Ekstraksiyon İşlemleri

Ekstraksiyon işlemleri için öncelikle kurutulmuş bitki örneği (2430 g) sıvı azot ile öğütülerek toz haline getirilmiştir. Şilifli balona konulan 80 g toz haldeki bitki örneğinin üzerine 200 mL deiyonize saf su ilave edilerek neo-clavenger aparatı yardımıyla (Şekil 3.1.a) 3-4 saat süreyle kaynatılarak sulu demlemesi yapılmıştır. Kalan bitki örneği 80 g örnekler halinde aynı işleme tabi tutularak sulu demleme işlemi tamamlanmış ve tüm örnekler birleştirilmiştir. Demlemenin ardından sulu kısım ve posayı ayırmak için örnek süzülüp oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Oda sıcaklığına gelen sulu kısım ekstraksiyon işlemi için ayırma hunisine koyularak üzerine etil asetat çözücüsü eklenmiştir (Şekil 3.1.b). Etil asetat ile ekstraksiyon sonucunda alt faz su fazı, üst faz etil asetat fazı olarak ayrılmıştır. Etil asetat fazına bir şey geçemeyene kadar bu işleme devam edilmiştir. Sonrasında etil asetat fazının çözücüsü buharlaştırılarak etil asetat ekstratı (EE) elde edilmiştir. Elde edilen EE etiketlenerek biyoaktivite çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C' ye kaldırılmıştır. Etil asetat ile ekstraksiyonundan ayrılan sulu kısım daha sonra n-bütanol ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Elde edilen n-bütanol fazı farklı bir kaba alınarak evaporasyon ile çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Bu ekstrat, BE olarak etiketlenerek biyoaktivite çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C' ye kaldırılmıştır. Karabaş otu bitkisinin su ile kaynatılması sonucu yapılan tüm ekstraksiyon işlemlerinin ardından 58,59 g EE ve 10,02 g BE elde edilmiştir.

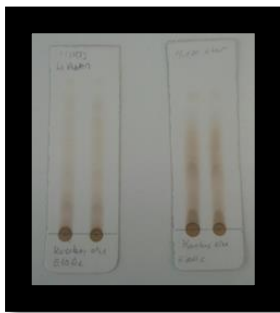


Şekil 3.1. a) Neo-clavenger aparatı yardımıyla Karabaş otunun sulu demlemesi, b) Çözücü ile ekstraksiyon işlemi

Ekstraksiyon işlemlerinin ardından ekstratlarla gerçekleştirilen biyoaktivite çalışmaları sonucunda, EE'nin BE'ye göre daha aktif olduğu görülmüştür. Bu nedenle, çalışmanın devamında biyoaktivite rehberli fraksiyonlama işlemleri ve fenolik içerik analizi belirleme çalışmalarına EE ile devam edilmiştir.

3.2.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) Analizi

Biyoaktivite rehberli taramalar sonucu aktif olduğu düşünülen EE'nin fenolik bileşen grubunu ortaya çıkarmak için İTK analizi yapılmıştır. Bu analiz için öncelikle, EE'nin yüksek oranda çözünürlüğü sağlanmıştır. Sonrasında EE, TLC silika jel 60 kaplı hazır alüminyum plakaya uygulanarak uygun çözücü sistemlerinde yürütülmüştür. İçeriğindeki moleküllere ait spotlar 254 nm'de UV ışık altında incelenmiştir. Spot renklerinin görünürlüğünün artırılması için silika jel plakalarına serik sülfat (seryum sülfat) belirteci püskürtülerek 100 °C sıcaklıkta oluşan spot renkleri incelenmiştir. Spot renklerinin görünürlüğünün artırılması için % 10 oranında sülfürik asit (H₂SO₄) içeren etanol belirteci püskürtülüp 135 °C'de oluşan renkler değerlendirilmiştir. EE'nin İTK görüntüleri Şekil 3.2' de verilmiştir.



Şekil 3.2. EE'nin ince tabaka kromatografisi görüntüleri

3.2.1.3 HPLC-TOF/MS Analizi

EE'nin fenolik bileşen içeriğinin aydınlatılması amacıyla analitik ayırmayı sağlayan HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) cihazı kullanılmıştır. Çalışmada, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozulan bileşiklerin ayrılmasını sağlamasının yanı sıra, duyarlı olması ve kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması nedeniyle Agilent technologies 1260 infinity LC, Agilent technologies 6210 TOF-MS cihazı tercih edilmiştir. EE ile yapılan HPLC analizleri Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya bölümünde hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

Bu analiz için EE, küçük deney tüplerine 2 mg olacak şekilde ayrılmıştır. Sonrasında tüplerdeki ekstratlara 2 mL metanol (HPLC grade) eklenerek ekstratın ultrasonik su banyosunda (Sellecta Ultrasons-H) çözünmesi sağlanmıştır. Ekstrat tamamen çözüldükten sonra, 1000 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltiler HPLC-TOF/MS tüplerine aktarılarak analiz için hazırlanmıştır. EE'nin HPLC-TOF/MS analizi için hazırlanma aşamaları Şekil 3.3' de görülmektedir.



Şekil 3.3. EE' nin HPLC-TOF/MS analizi öncesi hazırlanma aşamaları

Bu işlemlerin ardından ekstratın kantitatif analizi için, 25000 ppm konsantrasyonunda hazırlanan standartlar HPLC-TOF cihazında ölçülerek kullanılan programın uygunluğu değerlendirilmiştir. Uygunluğun kontrol edilmesinin ardından tüplere hazırlanan ekstratların analizleri gerçekleştirilmiştir (Agilent technologies 1260 infinity LC, Agilent technologies 6210 TOF-MS). Hazırlanan her ekstrat için 1000 ppm stok çözelti ve bu stok çözeltilerden 250 ppm konsantrasyonda yeni seyreltmeler yapılmıştır. Tüm bu çözeltiler HPLC-TOF/MS tüplerine aktarılmıştır. Analiz için kolon sıcaklığı 35 °C, cihazın enjeksiyon hacmi 10 µl, kullanılan kolon modeli de ZORBAX SB-C18 4,6x100 mm, 3,5 µm'dir. Fenolik bileşen içeriğinin aydınlatılması için kullanılan HPLC mobil faz programı Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. HPLC mobil faz programı

No	Zaman (dk)	% 0,1 Formik asit içeren dH ₂ O	Asetonitril
1	0	% 90	% 10
2	1	% 90	% 10
3	20	% 50	% 50
4	23	% 20	% 80
5	25	% 90	% 10
6	30	% 90	% 10

3.2.1.4 GC-MS Analizi (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometri)

GC-MS analizleri Agilent Technologies marka (GC 7890A equipped 5975 Triple Axis Detector) kütle spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizler için, HP5-MS Kolon (60 m x 320 m x 0,25 m), elektron iyonlaştırma enerjisi ve 70 eV'lik enerji kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak dakikada 1 mL/min akış hızı ile helyum kullanılmıştır. Analiz, Splitless modda injeksiyon hacmi 1 L olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Analiz edilen bileşiklerin yapıları cihazdaki Famedb23, Famdbwax and NIST05a kütüphanelerinde taranarak belirlenmiştir. GC-MS analizlerinin aşamaları aşağıda ayrıntılarıyla verilmiştir.

3.2.1.4.1. Sililleme Prosüdüğü

Bu analiz için öncelikle, EE'nin 1 mL metanol ile tüp içerisinde çözünmesi sağlanarak homojen bir çözelti elde edilmiştir. Daha sonra bu çözelti üzerine 300 µl kloroform eklenerek 12,000 rpm'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Böylece apolar özellikli maddeler kloroform fazına geçmesi sağlanarak tüpün alt kısmında oluşan çökelti elimine edilmiştir. Santrifüj sonrasında kloroform fazı yeni bir ependorfa alınıp üzerine 300 µl kloroform eklenerek 12,000 rpm'de 10 dk süre ile tekrar santrifüj yapılmıştır. Elde edilen supernatanttan 100 µl yeni ependorfa alınarak sililleme işlemine geçilmiştir. Ependorf tüp içerisindeki çözücülerin uçurulması için hızlı vakum konsantratörü (SpeedVac, Savant DNA 120, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Tüpler içerisindeki çözücü uzaklaştırıldıktan sonra, her bir tüpe 30 mg/mL piridin içerisinde çözülmüş olan 20 µl metoksiaminhidroklorid ilave edilerek 37 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her bir tüpe 40 µl MSTFA (N-metil-N-[trimetilsilil] triflorasetamid eklenmiştir. Elde edilen 60 µl'lik son hacim GC-MS kılcal tüplerine aktarılarak analize hazır hale getirilmiştir.

3.2.1.4.2. GC-MS Fırın Programı

GC-MS fırın programı için yapılan optimizasyon sonucunda başlangıç sıcaklığı 100°C olarak belirlenerek program başlatılmıştır. Bu sıcaklıkta 10 dk'lık inkübasyonun ardından dakikada 5°C artışla sıcaklık 200 °C'ye çıkarılıp bu sıcaklıkta 20 dk tutulmuştur. Yine dakikada 5°C'lik artışla sıcaklık 270 °C'ye yükseltilerek bu sıcaklıkta 36 dk bekletilmiştir. EE'nin GC-MS analizi ile yapılan içerik belirleme çalışmalarında EK1 Çizelge 1.1' de verilen bileşikler tespit edilmiştir.

3.2.1.5. EE'nin Kolon Kromatografisi ile Ayrıştırılması

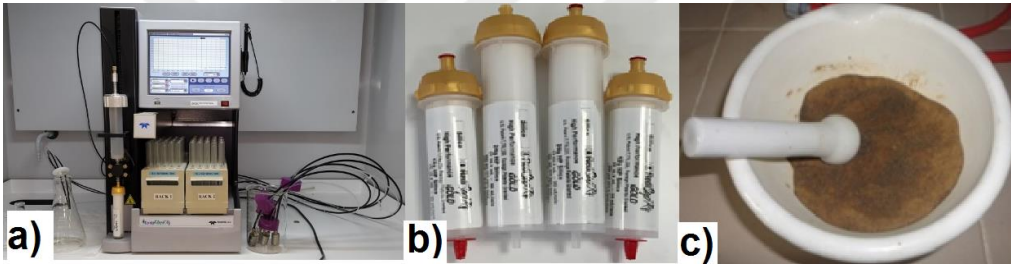
Hücre tabanlı *in vitro* yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen biyoaktivite rehberli tarama sonuçlarına göre, EE en aktif ekstrat olarak belirlenmiş ve etken bileşiklerin belirlenmesi için kolon kromatografisi kullanılarak fraksiyonlarına ayrıştırılmıştır. Bu analizde, Sephadex LH-20 kolon dolgu maddesi olarak seçilmiştir. Kromatografiye başlamadan 24 saat önce Sephadex LH-20 dolgu maddesi metanol çözücüsü ile muamele edilmiştir. Sonrasında yeterli şişme kapasitesine ulaşması için metanol/kloroform (% 35/% 65) karışımında bekletilmiştir. Sephadex LH-20 kolon dolgu maddesi, Şekil 3.4' de görüldüğü gibi 2 mm dış çap ve 1,8 mm iç çapa sahip, 80 cm uzunluğunda sinterli teflon musluklu kolon içerisine doldurulmuştur. Kolondan metanol/kloroform (% 35/% 65) karışımı sürekli geçirilerek yaklaşık 1 g EE kolona uygulanmıştır. Musluk yavaş bir şekilde akış sağlanacak şekilde açılarak fraksiyonlar toplanmıştır. Her bir fraksiyon tüpü en fazla 2-3 mL olacak şekilde sabit çözücü karışımıyla fraksiyonlandırma işlemi yapılarak, 63 fraksiyon elde edilmiştir. İTK kontrolü ile kromatografik işlemin sonlandırılmasına karar verilmiştir. Benzer fraksiyonlar İTK kontrolü ile birleştirilerek toplamda 12 (Fraksiyon kodları: E1→E12) fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonların saflık kontrolleri içerik analizleri ya da birleştirilme analizleri HPLC-TOF/MS (Agilent) ve 600 MHz' lik NMR cihazı (Agilent) ile belirlenmiştir. Elde edilen fraksiyonların adlandırılması Araştırma Bulguları Çizelge 4.1' de verilmiştir.



Şekil 3.4. EE'nin Sephadex LH-20 kolon dolgu maddesine uygulanması

3.2.1.6. Biyoaktif Fraksiyonların Flash Kromatografi ile Ayırıştırılması

Orta basınçlı sıvı kromatografisi olarak bilinen Flash Kromatografisi oldukça hassas, hesaplı ve kısa zamanda gerçekleştirilen, çoklu dalga boyu seçebilme özelliğine ve geniş dalga boyu aralığına sahip bir yöntemdir. Bu kromatografik ayırmada düşük miktardaki maddelerin uygun kolon (kartuş) ile ayrılması sağlanmaktadır. Bu çalışmada biyoaktif EE fraksiyonlarının ayırıştırılması için Flash Kromatografisi kullanılmıştır (Şekil 3.5.a). Flash kromatografisi için, 40 g HP silika içeren, 200 psi (14 bar) max. basınca dayanıklı, 6 mg-200 mg arasındaki örnek miktarını ayırabilme özelliklerine sahip kolon (Redi Sep RF-GOLD) kullanılmıştır (Şekil 3.5.b). Bu analiz için, öncelikle Karabaş otundan elde edilen EE homojenize edilebilmesi için silika jele emdirilmiştir. Bu işlemde yaklaşık 6 g ekstre 6 g silika jel 60 GF₂₅₄ kullanılarak, 1/1 oranında elusyon yapılmıştır (Şekil 3.5 c). Sonrasında karışım içerisinde çözücü kalmayacak şekilde çözücünün uçurulması sağlanmıştır.



Şekil 3.5. a) EE Fraksiyonlarının ayırıştırılması için kullanılan flash kromatografisi, b) Flash kromatografisi kolonları (kartuşları), c) EE

Flash kromatografisi için UV taramaları sonucunda 280 ve 360 nm dalga boylarında ayırım gerçekleştirilmiştir. Seçilen iki dalga boyunda gelecek maddeler tüplere toplanırken, diğer bütün renkli ve renksiz bileşikler çöp olarak toplanmıştır. Rackler içerisindeki tüplere en fazla 15 mL çözücü toplanacak şekilde program oluşturulmuştur. Düşük polariteli çözücü sistemlerinden başlanarak yüksek polariteli çözücü sistemine doğru çözücü karışımları kullanılmıştır. Flash kolonu önce dakikada 35 mL akış hızı olacak şekilde hekzan ile şartlandırılmıştır. Daha sonra uygun çözücü sistemlerinde ayırım gerçekleştirilmiştir. Bu analizdeki fraksiyon aralıkları ve kullanılan çözücü sistemleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Flash Kromatografisi fraksiyon aralığı ve çözücü sistemleri

Çözücü Sistemi	Zamanı aralığı	Fraksiyonlar
% 100 Hekzan	0-3 dk	W-1
% 100 Hekzan	3.1-4.7 dk	Rack-1
% 100 Hekzan	4.8-5.3 dk	W-2a
% 100 Hekzan	5.4-6.5 dk	Rack-1
% 100 Hekzan	6.6-25 dk	W-2b
% 100 Hekzan	25-31 dk	W-3
%50 CH₂Cl₂	31-43 dk	W-4
%50 Hekzan		
%50 CH₂Cl₂	43-63 dk	W-5
%50 Hekzan		
%50 CH₂Cl₂	63-80 dk	W-6
%50 Hekzan		
Karışım	80-83 dk	W-7
%100 Kloroform	83-101 dk	Rack-1
%100 Kloroform	101-108 dk	W-8
%100 Kloroform	109-120 dk	W-9
%100 Kloroform	120-136 dk	W-10
Karışım	136-140 dk	W-11
%5 Aseton	140-164 dk	Rack-1
%95 Kloroform		
%5 Aseton	164-218 dk	Rack-2
%95 Kloroform		
%10 Aseton	218-264 dk	Rack-2
%90 Kloroform		
%25 Aseton	264-300 dk	Rack-2
%75 Kloroform		
%50 Aseton	0-2.4 dk	W-12
%50 Kloroform		
%50 Aseton	2.4-51 dk	Rack-1 (301.fr)
%50 Kloroform		
%50 Aseton	51-82 dk	Rack-2 (382.fr)
%50 Kloroform		
%50 Aseton	82-116 dk	Rack-2 (435.fr)
%50 Metanol		
%50 Metanol	116-135 dk	FR-21-24

3.2.1.7. Fraksiyonların İzolasyon Çalışmaları

Fraksiyonlandırma sonucunda elde edilen 12 fraksiyondan E1, E2 ve E3 fraksiyonlarının NMR analizi sonucunda çözücüye ait pikler dışında herhangi bir pik görülmemiştir. Bundan dolayı bu fraksiyonlar pozitif ve negatif modlarda HPLC-TOF/MS cihazında analiz edilmiştir. Elde edilen analiz sonucuna göre ise, herhangi bir bileşiğe ait kromatogram ve iyon kütlesi görülmemiştir. Madde miktarı bakımından da az olan bu

fraksiyonlar bahsedilen sebepten dolayı çalışma dışında bırakılmıştır. Ayrıca, madde miktarı bakımından az olan E11 ve E12 fraksiyonları ise, E10 fraksiyonu ile birleştirilerek izolasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Biyoaktivite rehberli tarama çalışmaları sonucu hedeflenen etkiyi gösteren E8, E9, E10 fraksiyonlarıyla etken madde aydınlatma ve saflaştırma çalışmalarına devam edilmiştir. Elde edilen aktif fraksiyonlarla gerçekleştirilen izolasyon çalışmalarının ayrıntıları aşağıda verilmektedir.

3.2.1.7.1. E8 Fraksiyonunun İzolasyon Çalışması

Sephadex LH-20 ile elde edilen E8 fraksiyonunun Flash Kromatografisi ile izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Apolar dolgu maddesine sahip C18 (24 g) kartuş kullanılarak 280 ve 700 nm dalga boyları arasında ayırım gerçekleştirilmiştir. Sıvı enjeksiyon portu yardımıyla maddenin kolona yükleme işlemi yapılmıştır. Kromatografi işleminde mobil faz % 100 su ile başlatılmış, sonrasında % 10'luk metanol artış gradientleri ile fraksiyonlar tüplere toplanmıştır. Absorbans vermeyen maddeler 150 mL hacimlerde toplanılmıştır. Benzer fraksiyonlar İTK yardımı ile birleştirilerek az bir çözücü içerisinde kristallenmeye bırakılmıştır. Oluşan kristaller 400-500 µl dötero metanol (d_4 -Metanol) veya dötero DMSO (d_6 -DMSO) ile çözülerek 1D ve 2D NMR dataları ile yapı analizi yapılmıştır.

3.2.1.7.2. E9 Fraksiyonunun İzolasyon Çalışması

EE'nin Sephadex LH-20 ile elde edilen, aktivite değeri yüksek olan E9 fraksiyonundan Flash Kromatografisi ile sekonder metabolit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Apolar dolgu maddesine sahip C18 (24 g) kartuş kullanılarak 280 ve 700 nm dalga boyları arasında ayırım gerçekleştirilmiştir. Sıvı enjeksiyon portu yardımıyla maddenin kolona yükleme işlemi yapılmıştır. Kromatografi işleminde mobil faz % 100 su ile başlatılmış, sonrasında % 10'luk metanol artış gradientleri ile fraksiyonlar tüplere toplanmıştır. Absorbans vermeyen maddeler 150 mL hacimlerde toplanılmıştır. Benzer fraksiyonlar İTK yardımı ile birleştirilmiştir. Bu fraksiyonlar üzerinden tekrar küçük kolonlar içerisinde silikajel dolgu maddesi kullanılarak bileşik izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İTK sonuçlarına göre saf olan maddeler 400-500 µl dötero metanol (d_4 -Metanol) veya dötero DMSO (d_6 -DMSO) ile çözülerek 1D ve 2D NMR dataları ile yapı analizi yapılmıştır.

3.2.1.7.3. E10 Fraksiyonunun İzolasyon Çalışması

EE'nin Sephadex LH-20 ile ayrıştırması sonucu elde edilen fraksiyonlardan aktivite değeri yüksek olan E10 fraksiyonundan flash kromatografisi ile sekonder metabolit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Apolar dolgu maddesine sahip C18 (24 g) kartuş kullanılarak 280 ve 700 nm dalga boyları arasında ayırım gerçekleştirilmiştir. Sıvı enjeksiyon portu yardımıyla maddenin kolona yükleme işlemi yapılmıştır. Kromatografi işleminde mobil faz % 100 su ile başlatılmış, sonrasında % 10'luk metanol artış gradientleri ile fraksiyonlar tüplere toplanmıştır. Absorbans vermeyen maddeler 150 mL hacimlerde toplanmıştır. Benzer fraksiyonlar İTK yardımı ile birleştirilmiştir. Bu fraksiyonlar üzerinden tekrar küçük kolonlar içerisinde silikajel dolgu maddesi kullanılarak bileşik izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Saf olan maddeler 400-500 µl dötero metanol (d_4 -Metanol) veya dötero DMSO (d_6 -DMSO) ile çözülerek 1D ve 2D NMR dataları ile yapı analizi yapılmıştır.

3.2.1.7.4. E8, E9 ve E10 Fraksiyonlarının İçeriğindeki Moleküllerin Yapılarının Aydınlatılması

Flash kromatografisinden toplanan fraksiyonların İTK analizi ile saflıkları değerlendirilmiştir. Moleküllerin yapı analizleri için NMR tekniği kullanılmıştır. Bu analiz için örnekler d_6 -Aseton içerisinde çözülerek 600 MHz NMR cihazı ile içeriğindeki bileşiklerin yapısı belirlenmiştir. Bileşiklerin yapısındaki karbon ve protonların varlığı, bunların moleküldeki konumları ve uzaysal olarak yönelmesi 1D ve 2D NMR teknikleri ile belirlenmiştir. EK 2 Şekil 2.1-2.4'de E8 fraksiyonundan, EK 2 Şekil 2.5'de E9 fraksiyonundan, EK 2 Şekil 2.6-2.7'de E10 fraksiyonundan izole edilen bileşiklere ve NMR verilerine detaylı şekilde yer verilmiştir. Üst kısımda da bahsedildiği üzere, bu bölüme kadar yapılan kimyasal analizler Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof.Dr. İbrahim Demirtaş ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. EE ve BE'nin Total Polifenol Miktarlarının Belirlenmesi

EE ve BE'nin total polifenol miktarı Cheng ve ark.,'ları (2012) tarafından modifiye edilen Folin-Ciocalteu yöntemi (Singleton ve ark., 1965) kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntem, ekstratların içeriğindeki fenoliklerin hidroksil gruplarının spesifik redoks reaktifi olan Folin-Ciocalteu ile tepkimesi sonucu oluşan mavi renkli kompleksin ölçümüne dayanmaktadır. Analiz için öncelikle EE ve BE 1N Folin-Ciocalteu reaktifi (1:1, % 50 etanol ile seyreltilmiş) ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından % 20' lik

Na₂CO₃ eklenen örnekler, 40 °C' de 20 dk daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından karışım 16,000xg' de 30 sn santrifüj edilerek elde edilen supernatantın 100 µl'si 96 kuyucuklu plakaya koyulmuştur. Tepkime sonucu oluşan kompleksin verdiği absorbans 760 nm' de ölçülmüştür. Elde edilen total polifenol miktarları, gallik asit standardıyla oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Hücre Büyütme ve Pasajlama Çalışmaları

Çalışmada kullanılan tüm hücre hatlarının (H4IIE: sıçan hepatoma hücre hattı; C2C12: fare miyoblast hücre hattı; 3T3L1: fare preadiposit hücre hattı, RAW264.7: fare makrofaj hücre hattı, BTC-6: fare pankreatik insülinoma hücre hattı) laboratuvar ortamına adaptasyonu sağlanmış, büyümeleri ve pasajlanmaları yapılarak çalışma süresince yetecek miktarda stoklar oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılan tüm hücre hatlarının büyütülmesi ve pasajlanma işlemleri, % 10 FBS DMEM besiyeri içerisinde 37 °C, % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren ortamda yapılmıştır. Pasajlama işlemleri için hücreler % 90 yoğunluğa ulaştıklarında, % 0,25 Tripsin-EDTA ile flask yüzeyinden kaldırılarak 2000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiş, uygun miktardaki besiyerinde çözülmüştür. Sonrasında deney protokülüne uygun şekilde uygulama plakalarına ve büyütme flasklarına ekilerek çalışmalara devam edilmiştir.

3.2.4. C2C12 ve 3T3L1 Hücrelerinin Farklılaştırılması

C2C12 hücrelerinin farklılaşmasının gözlemlenebilmesi için hücreler, 24 kuyucuklu plakaya 4x10⁴, 6 kuyucuklu plakaya her bir kuyucuk 12x10⁴ hücre içerecek şekilde büyüme besiyeri (% 10 FBS içeren DMEM) içerisinde ekilmiştir. 2 gün sonunda % 90 oranında büyüyen hücrelerin besiyeri farklılaşma besiyeri (% 2 at serumu içeren fenol kırmızısı içermeyen DMEM) ile değiştirilmiştir. Farklılaşma besiyeri 2 ve 3. günlerde tazelenmiştir. 4. günün sonunda hücrelerin birbirleriyle birleşerek besiyeri içerisinde nükleer debriz salgıladıkları ve tamamen uzamış kas (miyotüp) hücreleri formuna geçtiği gözlemlenmiştir. Bölüm 4 Araştırma Bulguları Şekil 4.2' de farklılaşarak miyotüp formuna geçen hücreler görülmektedir.

Çalışmada kullanılan bir diğer hücre hattı 3T3L1 preadipositlerinin olgun adipositlere farklılaşmasını sağlamak amacıyla, hücreler 24 kuyucuklu plakaya her bir kuyucukta 3x10⁵ hücre olacak şekilde ekspansiyon besiyeri [% 10 bovine calf serum (BCS) içeren DMEM] içerisinde ekilmiştir. 2. gün sonunda besiyeri yenilenerek, 2 gün daha preadiposit ekspansiyonu sağlanmıştır. 4. günde hücrelerin besiyeri farklılaşma

besiyeri olarak adlandırılan, içerisinde 5 µM deksametazon, 500 µM IBMX ve 200 nM insülin bulunan % 10 BCS DMEM ile değiştirilmiştir. 6. günün sonunda hücrelerin besiyeri 200 nM insülin içeren % 10 BCS DMEM ile değiştirilmiştir. 8. günün sonunda tüm hücreler tekrar % 10 BCS içeren DMEM içerisine alınarak 2 gün süreyle tamamen adipositlere olgunlaşması sağlanmıştır. Olgunlaşan adipositler 10. günün sonunda gözlemlenmiştir. Bölüm 4 Araştırma Bulguları Şekil 4.3' de farklılaşan adipositlerdeki yuvarlak kesecikler halinde gözlemlenen lipid akümüülasyonu görülmektedir.

3.2.5. Oil Red O Boyaması

Olgunlaşan adipositlerdeki yuvarlak kesecikler halinde gözlemlenen lipid akümüülasyonunun doğrulanması için Oil Red O boyaması yapılmıştır. Bu deney için öncelikle, % 0,5 Oil Red O boyası izopropanol içinde stok çözelti olarak hazırlanmıştır. Sonrasında, % 0,5 Oil Red O konsantre solüsyonu su ile seyreltilerek % 60 oranında Oil Red O çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. 3T3L1 preadipositlerinin olgun adipositere farklılaşma periyodu tamamlandığında hücreler 1 kez PBS ile yıkanarak 1 saat boyunca % 10 formaldehit ile fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından hücreler önce PBS (1X) ile, sonrasında % 60 izopropanol ile yıkanarak, hücre plakası 10 dk çeker ocak altında bekletilmiştir. Kuyucuklardaki hücrelere belirlenen hacimde Oil Red O çalışma solüsyonu eklenerek hücreler 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından Oil Red O boyasını uzaklaştırmak için hücreler 2 kez distile su ile yıkanarak mikroskop altında gözlemlenmiştir. Bölüm 4 Araştırma Bulguları Şekil 4.4' de görüldüğü üzere, farklılaşan adipositlerde Oil red O boyamasıyla adipogenezisin gerçekleştiği doğrulanmıştır.

3.2.6. Hücre Canlılığı Çalışmaları

Karabaş otu sulu demlemesinden elde edilen ekstratların, fraksiyonların ve saf maddelerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek için, öncelikle bu partiyonların uygun çözücülerle çözünürlüğü sağlanmıştır. EE çözücüsünün kuyucuklardaki son konsantrasyonu % 0,25 olacak şekilde etil alkol içerisinde çözülmüştür. Bu oranda kullanılan etil alkol daha önce yapılan pek çok benzer çalışmada çözücü olarak güvenli bir şekilde kullanıldığı ve interferans yaratmadığı literatürde gözlemlenmiştir (Waterman ve ark., 2014; Boudreau ve ark., 2014). Her bir partiyon için tek bir çözücü kullanılması açısından diğer ekstrat/fraksiyon ve saf maddelerde % 50 oranında etil alkol içerisinde çözülerek son konsantrasyon % 0,25 olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. Ekstratların hücre canlılığı üzerine etkilerini belirlemek için hücrelere 24

saat süresince değişik konsantrasyonlarda (400, 200, 100, 50, 25, 12,5 ve 6,25 µg/mL) EE ve BE'nin uygulamaları yapılmıştır. 24 saat sonunda hücrelerin üzerine MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] eklenerek Mosmann (1983) metoduna göre hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Hücrelerin canlılık oranları, ELISA okuyucu ile 570 ve 690 (background) nm'de ölçülmüştür. Ayrıca kuyucuklara ektrat ile muamele etmediğimiz kontrol grubuna ek olarak % 0,25 etil alkol içeren besiyeri konulmuştur. Değişik konsantrasyonlardaki Karabaş otu ektratları ile muamele edilen doz grupları, kontrol (% 0,25 etil alkol içeren DMEM) ile karşılaştırarak, farklı dozlardaki ektratların farklı hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine olan etkisi saptanmıştır.

3.2.7. Fizyolojik Etki Çalışmaları

3.2.7.1. Ektratların, Fraksiyonların ve Saflaştırılan Bileşiklerin H4IIE Hücrelerinde Glukoneojenik Glukoz Üretimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

H4IIE hücreleri ile yapılan çalışmalarda, öncelikle hücreler % 2,5 at serumu ve % 2,5 FBS içeren DMEM içerisinde, her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Hücrelerin plaka yüzeyini tamamen kaplamalarının ardından (2 gün), Dex-cAMP ile glukoneojenezi indüklemek için (Govorko ve ark., 2007) hazırlanan serum içermeyen DMEM içerisinde ektratların (EE-BE: 25 ve 50 µg/mL), fraksiyonların (E1-E12: 25 µg/mL) ve saf maddelerin (RA: Rosmarinik asit, CA: Kafeik asit, LUT: Luteolin, PAME: Propanoik asit metil ester, A7G: Apigenin-7-glukozit, RA-CA: kaffeoyl rosmarinik asit: 50 µM) belirtilen dozlarda uygulamaları yapılmıştır. 2 mM metformin pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Uygulamanın ardından hücreler, 5 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. 5 saat sonunda, hücreler glukoz içermeyen, pürivat ve laktat gibi glukoneojenik substratlarla zenginleştirilmiş starvasyon besiyeri içerisine alınarak, tekrar aynı dozlarda izolatlar uygulanmıştır. 37°C'de % 5 CO₂ içeren ortamda 3 saat süren inkübasyon periyodunun ardından, besiyerleri toplanarak içeriklerindeki (hücreler tarafından üretilen ve besiyerine salınan) glukoz miktarları glukoz assay kiti (Biovision) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda tayin edilmiştir. Besiyerlerinin toplanmasının ardından hücrelere lizis tamponu eklenerek BCA kiti ile protein miktarları ölçülmüştür. Hesaplanan glukoz konsantrasyonları, hücre lizatlarından tayin edilen protein konsantrasyonları ile normalize edilmiştir.

3.2.7.2. Ekstratların H4IIE Hücrelerinde Glukoz Tüketimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

EE ve BE'nin H4IIE hepatoma hücrelerinde glukoz tüketimi üzerine etkisini belirlemek için öncelikle hücreler % 2,5 FBS ve % 2,5 at serumu içeren DMEM içerisinde her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Hücreler kültür plakasını tamamen kaplamalarının ardından (2 gün), % 0,3 BSA (bovine serum albumin) içeren düşük glukozlu (5,5 mmol/L) uygulama besiyerleri içerisinde EE ve BE (25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ dozlarında) ile muamele edilmiştir. 24 saat sonunda besiyerleri toplanarak, besiyerlerindeki tüketim sonrası kalan glukoz miktarları glukoz assay kiti (Biovision) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda belirlenmiştir. Hücre olmayan besiyeri kültür plakalarında hücrelerle aynı koşullarda bekletilmiştir. Deney sonrası, glukoz tüketim miktarları hücre olmayan besiyerindeki glukoz konsantrasyonundan çıkarılarak hesaplanmıştır. Hesaplanan glukoz konsantrasyonları, hücre lizatlarından tayin edilen protein konsantrasyonları ile normalize edilmiştir.

3.2.7.3. Ekstratların İnsülin Direnci Geliştirilen C2C12 Miyotüplerinde Glukoz Alımı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

EE ve BE'nin C2C12 miyotüplerindeki glukoz alımı üzerine etkisini belirlemek için ilk olarak hücreler % 10 FBS içeren DMEM içerisinde her kuyucukta 3×10^4 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Miyoblastların kültür plakasını tamamen kaplamalarının ardından (3 gün), % 2 at serumu içeren farklılaşma besiyeri içerisinde 4 gün boyunca miyotüplere farklılaşması sağlanmıştır. Dördüncü gün sonunda tamamen miyotüplere farklılaşan hücreler, insülin direnci oluşturma amacıyla serbest yağ asidi (Palmitik asit) içermeyen (-) SYA ve içeren (+) SYA uygulama besiyeri kullanılarak ekstratların farklı dozları (25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$) ile gece boyu inkübe edilmiştir. Ardından, % 0,3 BSA içeren DMEM içerisinde 4 saat süreyle serum starvasyonu yapılmıştır. Bu protokol ve uygulama besiyerinin içeriği Çizelge 3.3' de ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. 4 saat sonunda hücreleri glukozdan yoksun bırakmak için her bir kuyucuğa 100 μl % 2 BSA içeren KRPH (Krebs-Ringer-Phosphate-HEPES) tamponu eklenerek hücreler 40 dk boyunca inkübe edilmiştir. 40 dk sonunda glukoz taşıyıcılarını aktive etmek için 20 dk 100 nM insülin uygulaması yapılmıştır. Ardından hücrelere glukoz girişini sağlamak için 20 dk 2-deoksiglukoz uygulaması yapılmıştır. Sonrasında ortamdan glukozu uzaklaştırmak için hücreler PBS (1X) ile 3 kere yıkanmıştır. Ardından glukoz uptake kiti (Biovision)

kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda hücrelere alınan glukozun seviyesi belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. İnsülin direnci oluşturulmasında gruplara özgü kullanılan uygulama besiyerlerinin bileşimi ve oranları

<i>Gruplar</i>	<i>Uygulama Besiyeri (1:40)</i>	
(-) SYA	% 20 BSA içeren DMEM (1) Farklılaşma besiyeri (% 2 At serumu içeren DMEM) (40) 1:40 oranında karıştırılır.	Gece boyu inkübasyon
(+) SYA	% 20 BSA- Na-palmitat konjugatı içeren DMEM (1) Farklılaşma besiyeri (% 2 At serumu içeren DMEM) (40) 1:40 oranında karıştırılır.	
EE-25 µg/mL		
EE-50 µg/mL		
BE-25 µg/mL		
BE-50 µg/mL		
(-) SYA	% 20 BSA içeren DMEM (1) % 0,3 BSA içeren düşük glukozlu DMEM (40) 1:40 oranında karıştırılır.	Gece boyu inkübasyonun ardından 4 saat inkübasyon
(+) SYA	% 20 BSA-Na palmitat konjugatı içeren DMEM (1) % 0,3 BSA içeren düşük glukozlu DMEM (40) 1:40 oranında karıştırılır.	
EE-25 µg/mL		
EE-50 µg/mL		
BE-25 µg/mL		
BE-50 µg/mL		

3.2.7.4. Saflaştırılan Aktif Maddelerin BTC-6 (fare pankreatik beta hücre hattı)

Hücre Hattında İnsülin Salınımı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

BTC-6 hücreleri 24 kuyucuklu plaka içerisine her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler kültür plakasında uygun yoğunluğa ulaştıktan sonra Krebs-Ringer bikarbonat/HEPES tamponu pH 7.4 (HEPES: 10 mM, NaCl: 129 mM, MgSO₄: 1,2 mM, NaHCO₃:5 mM, CaCl₂: 2,56 mM, KCl:4,7mM, KH₂PO₄: 1,2 mM) ile bir kere yıkanarak, 30 dk süreyle glukoz içermeyen Krebs/HEPES tamponu içinde 37 °C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında her bir kuyucuğa glukoz konsantrasyonu 25 mM olan besiyeri eklenerek saflaştırılan bileşiklerin (RA, CA, LUT, PAME, A7G, L7G, BA, RA-CA) 50 µM dozda uygulamaları yapılmıştır. Hücrelerin 6 saat boyunca 37 °C’de inkübasyonlarının ardından besiyerlerine salınan insülin miktarlarının ölçümü için besiyerleri toplanarak - 80°C’ de muhafaza edilmiştir. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ELISA kit

protokolü (Raybiotech) uygulanarak hücreler tarafından besiyerine salınan insülin miktarları belirlenmiştir. İnsülin salınım miktarları hücre lizatlarından tayin edilen protein konsantrasyonları ile normalize edilmiştir.

3.2.7.5. Ekstratların ve Saflaştırılan Aktif Maddelerin 3T3L1 Adipositlerinde Gliserol Salınımı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

3T3L1 adiposit hücrelerinde gliserol salınımını ölçmek için hücreler öncelikle % 10 BCS içeren DMEM içerisinde, her bir kuyucukta 3×10^4 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Preadipositlerin kültür plakalarının yüzeyini tamamen kaplamalarının ardından (4 gün), 2 gün farklılaşma besiyeri (5 mM IBMX, 50 μ M deksametazon ve 200 nM insülin), 2 gün 200 nM insülin içeren besiyeri, 2 gün de % 10 BCS içeren besiyeri içerisinde 6 gün boyunca adipositlere farklılaşmaları sağlanmıştır. Farklılaşmanın ardından, olgun adipositlere ekstratların 25 ve 50 μ g/mL dozları ile aktif olduğu düşünülen saf maddelerin (RA, CA, LUT, PAME, A7G, RA-CA) 50 μ M dozu uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından hücreler lipoliz yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Lipoliz kit protokülünde belirtilen konsantrasyonda isoproterenol ile lipolizin indüklenmesi sağlanmıştır. İsopteranol ile indüklenen lipoliz sonucu besiyerine salınan gliserol miktarları üretici firmanın protokolü doğrultusunda belirlenmiştir. Elde edilen gliserol konsantrasyonları, hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonları ile normalize edilmiştir.

3.2.8. Protein Ekspresyon Analizleri

3.2.8.1. Hücre Lizatlarında Total Protein Miktarının Tayini

Hücre lizatlarındaki total protein miktarı, BCA assay kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda belirlenmiştir. Fizyolojik etki çalışmalarının ardından elde edilen verilerin normalizasyonu için lizis tamponu ile hücrelerdeki protein içeriği açığa çıkarılmıştır. Ardından, kültür plakasındaki hücreler toplanarak $14,000 \times g$ 'de $4^\circ C$ 'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Bikinkoninik Asit (BCA) kiti ile hücre lizatındaki protein miktarları belirlenmiştir. BCA yöntemi, alkali çözeltideki proteinlerin, Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirgeyerek, Cu^{+1} 'in BCA ile oluşturduğu mor renkli kompleksin 562 nm' de spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. BSA standart olarak kullanılmıştır.

3.2.8.2. C2C12 Fare İskelet Kası Hücrelerinde İnsülin Direnci Oluşturulması ve Western Blot Analizleri için Proteinlerin Toplanması

SDS PAJE ve Western blot analizi için, miyoblast hücreleri % 10 FBS içeren DMEM içerisinde, her kuyucukta 12×10^4 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Miyoblast hücrelerinin farklılaşma besiyeri içerisinde (% 2 at serumu içeren besiyeri) 4 gün boyunca miyotüplere farklılaşması sağlanmıştır.

C2C12 miyoblastlarının miyotüplere farklılaşmasının ardından, hücrelerde insülin direnci oluşturmak için serbest yağ asidi içeren besiyeri içerisinde izolatların (ekstrat/fraksiyon yada saf maddeler) farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. Buna göre, Çizelge 3.3' de verilen besiyerleri içerisinde (-) SYA (kontrol) ve (+) SYA (kontrol), ekstratların (EE-BE: 25 ve 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), fraksiyonların (E1-E12: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve saf maddelerin (RA, CA, LUT, PAME, A7G, RA-CA: 50 μM) belirtilen dozlarda uygulamaları yapılarak hücreler gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün, % 0,3 BSA içeren düşük glukozlu DMEM kullanılarak Çizelge 3.3' de açıklandığı gibi 40:1 oranında hazırlanan uygulama besiyeri içerisinde ekstrat, fraksiyon ve saf maddelerin tekrar aynı dozlarda uygulamaları yapıp, hücreler 4 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından, her bir kuyucuğa 10 dk 100 nM insülin uygulaması yapılmıştır. 10 dk sonra hücreler RIPA tamponu [radyo immuno presipitasyon assay tamponu pH 8,0: 50 mM Tris, 150 mM sodyum klorür, % 0,1 SDS (sodyum dodesil sulfat), % 0,5 sodyum deoksikolat, % 1 Triton X-100] ile toplanmıştır. Hücre lizatları SDS-PAJE ve Western blot analizlerinde kullanılmak üzere $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir. RIPA tamponu ile toplanan hücre lizatlarındaki total protein miktarı, BCA assay kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda belirlenmiştir.

3.2.8.3. H4IIE Hepatoma Hücrelerinde İnsülin Direnci Oluşturulması ve Western Blot Analizleri için Proteinlerin Toplanması

SDS PAJE ve Western blot analizi için, H4IIE hücreleri % 2,5 FBS ve % 2,5 at serumu içeren DMEM içerisinde, 4×10^5 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. H4IIE hücrelerinde insülin direnci geliştirmek için, C2C12 hücrelerine uygulanan serbest yağ asidi ile insülin direnci prosedürü kullanılmıştır. Buna göre, Çizelge 3.4' de belirtildiği gibi hazırlanan besiyerleri içerisinde (-) SYA (kontrol) ve (+) SYA (kontrol), ekstratların (EE-BE: 25 ve 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve saf maddelerin (RA, CA, LUT, PAME, A7G, RA-CA: 50 μM) belirtilen dozlarda uygulamaları yapılarak hücreler gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün, % 0,3 BSA içeren düşük glukozlu DMEM

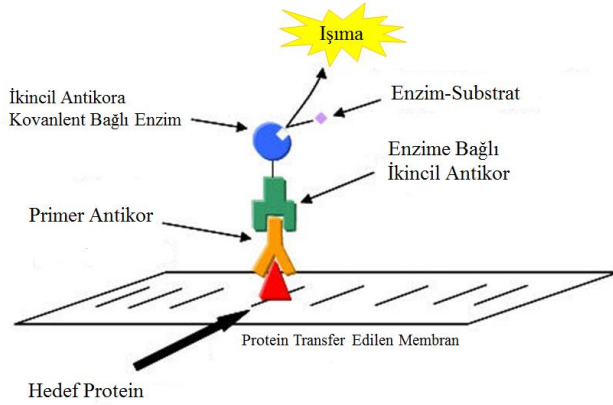
kullanılarak Çizelge 3.4' de açıklandığı gibi 40:1 oranında hazırlanan uygulama besiyeri içerisinde ekstrat ve saf maddelerin uygulamaları tekrar yapılarak, hücreler 4 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından, her bir kuyucuğa 10 dk 100 nM insülin uygulaması yapılmıştır. 10 dk sonra hücreler RIPA tamponu ile toplanmıştır. Hücre lizatları SDS-PAJE ve Western blot analizlerinde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir. RIPA buffer ile toplanan hücre lizatlarındaki total protein miktarı, BCA assay kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda belirlenmiştir.

3.2.8.4. Saflaştırılan Aktif Maddelerin BTC-6 (sıçan pankreatik beta) Hücrelerinde GLUT-2 Protein Seviyesi Üzerine Etkilerin Belirlenmesi

BTC-6 hücreleri 6 kuyucuklu plaka içerisine her kuyucukta 4×10^5 olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin plakanın yüzeyini tamamen kaplamalarının ardından Krebs-Ringer bikarbonat/HEPES tamponu pH 7,4 ile bir kere yıkanarak, 30 dk süreyle glukoz içermeyen Krebs/HEPES tamponu içinde 37 °C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında her bir kuyucuğa glukoz konsantrasyonu 25 mM olan besiyeri eklenerek saflaştırılan bileşiklerin (RA, CA, LUT, PAME, L7G, A7G, RA-CA, BA) 50 µM dozda uygulamaları yapılmıştır. 37 °C'de CO₂ inkübatöründe 8 saat süren inkübasyonlarının ardından, hücreler RIPA tamponu ile toplanmıştır. Elde edilen hücre lizatındaki protein konsantrasyonları BCA assay kiti kullanılarak tayin edilmiştir. Hücre lizatları SDS-PAJE ve Western blot analizlerinde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir. RIPA tamponu ile toplanan hücre lizatlarındaki total protein miktarı, BCA assay kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda belirlenmiştir. BSA standart olarak kullanılmıştır.

3.2.8.5. SDS-PAJE ve Western Blot Teknikleri

C2C12, H4IIE, 3T3L1, BTC-6'den elde edilen proteinler dikey elektroforez tekniği ile SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAJE) yöntemi kullanılarak ayrıştırılmıştır (Laemmli, 1970). Her bir hedef molekülün protein düzeyleri spesifik antikorlar kullanılarak Western Blot tekniği ile immunolojik olarak tayin edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Spesifik antikorlar kullanılarak proteinlerin immünolojik analizi (<https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresis.htm>' den uyarlanmıştır)

Poliakrilamit jel elektroforezi (PAJE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970)' de tanımlanan kesintili tampon sisteminde gerçekleştirilmiştir. Farklı moleküler ağırlıklara sahip proteinler için ayrıştırıcı jel konsantrasyonları optimize edilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. SDS-PAJE yönteminde kullanılan ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel bileşenleri

Stok Çözeltiler (mL)	Ayrıştırıcı Jel (% 8,5)	Ayrıştırıcı Jel (% 12)	Sıkıştırıcı Jel (% 4)
Jel Çözeltisi	8,5	12	1,3
Distile Su	13,55	10,04	6,1
Ayrıştırıcı Jel Tamponu Tris-HCl, pH: 8,8	7,5	7,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu Tris-HCl, pH: 6,8	-	-	2,5
% 10 SDS	0,3	0,3	0,1
% 10 APS	0,15	0,15	0,050
TEMED	0,015	0,015	0,010

Hücrelerden elde edilen proteinler BioRad dikey elektroforez sistemi kullanılarak elektroforetik olarak ayrıştırılmıştır. Elektroforetik ayrıştırmanın ardından yapılan Western blot analizi için, elektroforez sistemindeki jel, transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve % 10 metanol) içerisinde 10 dk boyunca sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübe edilmiştir [Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987)'da tanımlandığı gibi].

Elektroforetik transfer için kullanılan Electroblotter'ın platinyum tabanına önceden transfer tamponu kullanılarak nemlendirilmiş Whatman kağıdı yerleştirilerek olası kalabilecek hava kabarcıklarını gidermek amacıyla bir deney tüpü üzerinde yuvarlanmıştır. Whatman kağıdı üzerine dikkatlice yerleştirilen jelin üzerine nitroselüloz membran dikkatlice yerleştirilerek üzerine önceden ıslatılmış başka bir Whatman kağıdı koyularak sandviç tamamlanmıştır. Hava kabarcıklarının tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için membranı kendi pozisyonunda sabit tutarken bir deney tüpü nazikçe üzerinde yuvarlanmıştır. Elektroforetik transfer tankı, sandviçler tamamen tamponun içerisinde kalacak şekilde transfer tamponu ile doldurulup güç kaynağına bağlanmıştır. Voltaj 90 V'a ayarlanarak proteinler 2 saat süresince elektroforetik olarak transfer edilmiştir. Transfer işleminin ardından membran proteinlerin bulunduğu yüzey üstte kalacak bir biçimde bir kaba alınmıştır. Ardından 1 saat boyunca; fosforile proteinler için TBST içinde % 5 BSA içeren, fosforile olmayan proteinler için TBST içinde % 5'lik yağsız süt tozu içeren bloklama çözeltisi ile sabit hızlı çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra, fosforile proteinlerin tayinin gerçekleştirileceği membran, % 5 BSA içeren TBST içerisinde hazırlanmış primer antikor ile, fosforile olmayan proteinlerin tayininin yapılacağı membran, % 5'lik yağsız süt tozu içeren TBST çözeltisi içinde önerilen konsantrasyonlarda hazırlanan primer antikorlar ile gece boyu inkübe edilmiştir. Primer antikorlarla gece boyu inkübasyonun sonrasında membran, işaretleyici enzim-Horse Radish Peroksidaz ile bağlı olan ikincil antikorlarla inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodundan sonra membran Western Blotting Luminol Solüsyonu ile muamele edilerek protein bantları C-DiGit® Blot Scanner cihazında görüntülenmiştir. Protein bantları, Image Studio Digits software ile densitometrik olarak analiz edilmiştir. Elde edilen protein bantları β -aktin'e göre normalize edilmiştir.

3.2.9. Gen Ekspresyon Analizleri

3.2.9.1. Ekstratların, Fraksiyonların ve Saflaştırılan Bileşiklerin H4IIE Hücrelerinde Glukoneojenezde Rol Oynayan Hedef Genlerin Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Ekstratların, fraksiyonların ve saflaştırılan bileşiklerin, glukoneojenez yolağında düzenleyici rol oynayan PEPCK ve G6Paz genlerinin mRNA seviyeleri üzerine etkileri Real time-PCR analizi ile belirlenmiştir. Bu analiz için H4IIE hepatoma hücreleri, % 2,5 at serumu ve % 2,5 FBS içeren DMEM içerisinde, her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Hücreler plakaların yüzeyini tamamen

kapladıktan sonra (2 gün), glukoneojenezi indüklemek için Dex-cAMP ile hazırlanan besiyeri içerisinde ekstratların (EE-BE: 25 ve 50 µg/mL), fraksiyonların (E1-E12: 25 µg/mL), saf maddelerin (50 µM) belirtilen dozları hücelere uygulanmıştır. Uygulamanın ardından hücreler 8 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir. Süre sonunda TRIzol® solüsyonu kullanılarak toplanan hücrelerden üretici firmanın talimatları doğrultusunda RNA İzolasyonu yapılmıştır. Elde edilen RNA kalitesi % 1 agaroz jel elektroforezinde görüntülenirken, saflıkları ve konsantrasyonları Nanoquant cihazı kullanılarak belirlenmiştir. RNA konsantrasyonlarının belirlenmesinin ardından high capacity cDNA reverse transkripsiyon kiti (Applied Biosystems) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Ardından, uygulanan ekstrat/fraksiyon/saf maddelerin gen ekspresyon seviyelerine etkilerini değerlendirmek için, PEPCCK ve G6Paz genlerine özgü TaqMan® problemleri kullanılarak Real time-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Real time analizlerinde kullanılan cDNA miktarları optimize edilmiştir. Her genin ayrı olarak yapılan amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturularak erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Amplifikasyonun ardından elde edilen gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmalı ddCt metodu kullanılarak ile β-aktin Ct değerine karşı normalize edilerek hesaplanmıştır. Dex-cAMP ile indüklenen kontrol ddCt değeri kalibrator olarak kullanılmış ve 1 kabul edilmiştir.

3.2.9.2. Saflaştırılan Bileşiklerin BTC-6 Hücrelerinde Glukokinaz mRNA Seviyesi Üzerine Etkilerin Belirlenmesi

BTC-6 hücreleri 24 kuyucuklu plaka içerisine her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler kültür plakasında uygun yoğunluğa ulaştıktan sonra Krebs-Ringer bikarbonat/HEPES tamponu pH 7.4 ile bir kere yıkanarak, 30 dk süreyle glukoz içermeyen Krebs/HEPES tamponu içinde 37 °C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında her bir kuyucuğa glukoz konsantrasyonu 25 mM olan besiyeri eklenerek saflaştırılan bileşiklerin (RA, CA, LUT, PAME, A7G, RA-CA) 50 µM dozda uygulamaları yapılmıştır. Hücreler, 6 saat süreyle 37 °C’de inkübe edilmiştir. Sonrasında, TRIzol® solüsyonu kullanılarak toplanan hücrelerden üretici firmanın talimatları doğrultusunda RNA İzolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA kalitesi % 1 agaroz jel elektroforezinde görüntülenirken, saflıkları ve konsantrasyonları Nanoquant cihazı kullanılarak belirlenmiştir. RNA konsantrasyonlarının belirlenmesinin ardından high capacity cDNA reverse transkripsiyon kiti (Applied Biosystems) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Ardından, uygulanan maddelerin gen ekspresyon seviyelerine

etkilerini değerlendirmek için, Glukokinaz genine özgü spesifik primer ve SyBR Green reaksiyon karışımı kullanılarak Real time-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon koşulları, 95 °C 2 dk, 40 döngü: 94 °C 15 sn, 60 °C 1 dk olarak optimize edilmiştir. Amplifikasyonun ardından elde edilen gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmalı ddCt metodu kullanılarak ile β -aktin Ct değerine karşı normalize edilerek hesaplanmıştır.

3.2.9.3. Saflaştırılan Bileşiklerle H4IIE Hücrelerindeki Transkriptom Analizleri için Kullanılan Yöntemler

Aktif olduğu tespit edilen ekstratın (EE) ve RA, CA, RA-CA ve LUT bileşiklerinin insülin direncine karşı etkileri H4IIE hücre hattında tüm genom transkriptom analizleri ile de teyit edilmiştir. Agilent SurePrint G3 sıçan GE 8X60K Mikroarray'ler (Agilent®) tüm genom gen ekspresyonu analizlerinde kullanılan ve her bir gene özgü prob lar içeren microarray çipleridir. Kullanılan çipler üzerinde kodlanmış ve üzerine purifiye edilmiş cRNA'ların hibridize olabileceği şekilde tasarlanmışlardır. Total mRNA örneklerinden purifiye edilmiş cRNA örnekleri, çip yüzeyine hibridize edilmiştir. Bir çip üzerinde 8 örnek çalışmak için ayrı kanallar yer almaktadır. Her bir kanal tüm genom boyu dağılmış yaklaşık 60,000 farklı prob içermektedir.

Bu analiz için H4IIE hepatoma hücreleri, % 2,5 at serumu ve % 2,5 FBS içeren DMEM içerisinde, her kuyucukta 3×10^5 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. H4IIE hücrelerinin plaka yüzeyini tamamen kaplamalarının ardından, insülin direnci oluşturmak için, serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturma prosedürü kullanılmıştır. Buna göre, Çizelge 3.3' de belirtildiği gibi hazırlanan besiyerleri içerisinde seçilen saf maddelerin ve etkin ekstratın (RA, CA, LUT, RA-CA: 50 μ M, EE: 25 μ g/mL) belirtilen dozda uygulamaları yapılarak hücreler gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün, % 0,3 BSA içeren düşük glukozlu DMEM kullanılarak Çizelge 3.3' de açıklandığı gibi 40:1 oranında hazırlanan uygulama besiyeri içerisinde saf maddelerin uygulamaları tekrar yapılmıştır ve hücreler 4 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından, TRIzol® solüsyonu kullanılarak toplanan hücrelerden üretici firmanın talimatlarına göre RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları Nanoquant cihazında belirlenmiştir. Sonrasında elde edilen RNA'lar tüm genom üzerinde karşılaştırılmalı gen ekspresyon analizleri için firmaya ulaştırılmıştır.

Bu çalışmalarda firmaya kuru buz içerisinde, yukarıda anlatıldığı gibi uygulama yapılan ve kontrol hücrelerinden elde edilmiş toplam yedi grup RNA gönderilmiştir. Bu

gruplar, 1. Grup: (+) SYA (insülin direnci geliştirilen), 2. Grup: (-) SYA (normal kontrol), 3. Grup: RA 50 µM (+) SYA, 4. Grup: CA 50 µM (+) SYA, 5. Grup: RA-CA 50 µM (+) SYA, 6. Grup: LUT 50 µM (+) SYA, 7. EE 25 µg/mL (+) SYA'dır. Gönderilen bu RNA'ların kalite kontrolleri ve konsantrasyon ölçümleri tarafımızca Nanoquant cihazı (Tecan Infinite® M200 PRO) kullanılarak belirlenmiş, firma tarafından da Agilent 2100 Bioanalyzer cihazı kullanılarak teyit edilmiştir.

Her bir işaretlenmiş 750 ng cRNA, 1 µl 25X parçalama tamponu ve 5 µl 10X bloke tamponu eklenerek parçalanmış ve daha sonra 30 dk. boyunca 60 °C' de ısıtılmıştır. Son olarak 25 µl 2X hibritleme tamponu eklenerek seyreltilmiştir. Seyreltilen cRNA'lar conta ile sızdırmazlık sağlanan slayt içine verilmiş ve Agilent SurePrint G3 sıçan GE 8X60K Mikroarray'ler (Agilent®) monte edilmiştir. Slaytlar bir Agilent hibridizasyon fırınında 65 °C'de 17 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra, Agilent Tek Renk mikrodizi tabanlı gen ekspresyon analizi protokolü (Agilent Technology, V 6,5, 2010) kullanarak, oda sıcaklığında yıkanmıştır ve hibritlenmiş dizi Agilent "Microarray" Tarayıcı ile taranmıştır.

Elde edilen ham veri "Agilent Feature Extraction Software (v11.0.1.1)" ile elde edilmiştir. Aynı gen için ham veriler daha sonra dizideki tanınacak her gen için ifade verisi sağlayan, ham veri metin dosyası oluşturularak depo edilmiştir. Örnekler işaret kullanılarak filtrelenmiş ve seçilen sinyal değeri logaritmik olarak dönüştürülmüş ve "quantile" yöntemiyle normalize edilmiştir. Tüm bunlara ek olarak normalize edilen veriler (hangi grupta oldukları göz önüne alınmadan) örneklerin tüm genom gen ekspresyon profillerinin hiyerarşik kümeleme analizleri 'Correlation-average' yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur. Ayrıca teknik replika olarak çalışılan örneklerden elde edilen prob işimlerinin ortalama verileri hesaplanarak elde edilen grup verisinin hiyerarşik kümeleme sonucu elde edilmiştir. Analizler yapılırken ana gruplar kendi içerisinde değerlendirilmiştir. Çalışmada örnek bazında sadece teknik replikalar alt grupları oluşturduğundan dolayı; problemlerin ekspresyon ölçümlerindeki 'kat değişim' (Fold Change) miktarları göz önünde bulundurulmuştur. Her ikili karşılaştırmada anlamlı değişim tespit edilen problemler ve ekspresyon seviyeleri kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme genlerin ve örneklerin ekspresyon paternlerine göre gruplandırılması yapılmıştır. Önemli prob listesi için gen- zenginleştirilmesi ve fonksiyonel ek açıklama analizi DAVID Biyoinformatik veritabanı kullanarak (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.4. RA-CA'nın RAW264.7 Makrofaj hücrelerinde Nrf-2 Aracılıklı Mekanizmasının Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında izole edilen EE'den saflaştırılan hibrit RA-CA molekülünün biyoaktivitesi ilk defa bu çalışma kapsamında gösterilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda aktif olduğu düşünülen bu maddenin, MetS patojenezinde rol oynayan kronik düşük seviyeli inflamasyonda düzenleyici etki sağlayan Nrf-2 molekülünün mekanizması üzerine etkisi gen sessizleştirme yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Öncelikle RAW264.7 makrofaj hücreleri her kuyucukta $7,5 \times 10^5$ olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür plakalarına ekilmiştir. Hücrelerin % 50-60 yoğunluğa ulaşmasının ardından, gen sessizleştirme prosedürü uygulanmıştır. Buna göre, Opti-MEM içerisinde uygun konsantrasyonlarda Lipofectamine® 2000 transfeksiyon reaktifi, kontrol siRNA ve Nrf-2 siRNA uygulamaları yapılarak 24 saat boyunca Nrf-2 siRNA gruplarında genin sessizleştirilmesi sağlanmıştır. Sonrasında, Kontrol-siRNA ve Nrf-2 siRNA gruplarında inflamasyon modelinin gelişimini sağlayan LPS'nin (Lipopolisakkarit: $1 \mu\text{g}/\text{mL}$) ve RA-CA ($50 \mu\text{M}$) uygulamaları yapılarak hücreler 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, hücreler TRIzol® solüsyonu ile toplanarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA kalitesi % 1 agaroz jel elektroforezinde görüntülenirken, saflıkları ve konsantrasyonları Nanoquant cihazı kullanılarak belirlenmiştir. RNA konsantrasyonlarının belirlenmesinin ardından high capacity cDNA reverse transkripsiyon kiti (Applied Biosystems) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Ardından, uygulanan RA-CA molekülünün gen ekspresyon seviyelerine etkilerini değerlendirmek için, HO-1, NQO1 ve iNOS genlerine özgü TaqMan® problemleri kullanılarak Real time-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Real time analizlerinde kullanılan cDNA miktarları optimize edilmiştir. Her genin ayrı olarak yapılan amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturularak erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Amplifikasyonun ardından elde edilen gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmalı ddCt metodu kullanılarak ile β -aktin Ct değerine karşı normalize edilerek hesaplanmıştır. LPS ile indüklenen kontrol ddCt değeri kalibrator olarak kullanılmıştır.

3.2.10. İstatiksel Analizler

Yapılan analizler sonucu elde edilen verilerin her biri Ortalama \pm Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Grup içi ve gruplar arasındaki anlamlı farklılıkların analizi için

Bağımsız örneklem t-test ve parametrik olmayan Mann-Whitney U testleri kullanılmıştır. α -anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.



BÖLÜM 4

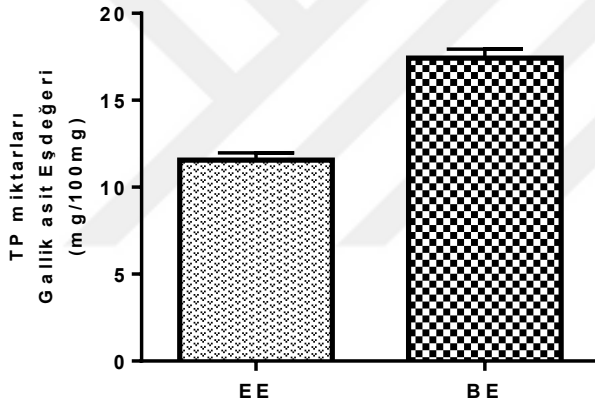
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Bulguları

4.1.1. Biyoaktivite Rehberli Analizlerle Aktif Ekstratın Belirlenmesi

4.1.1.1. EE ve BE'nin Total Polifenol Miktarları

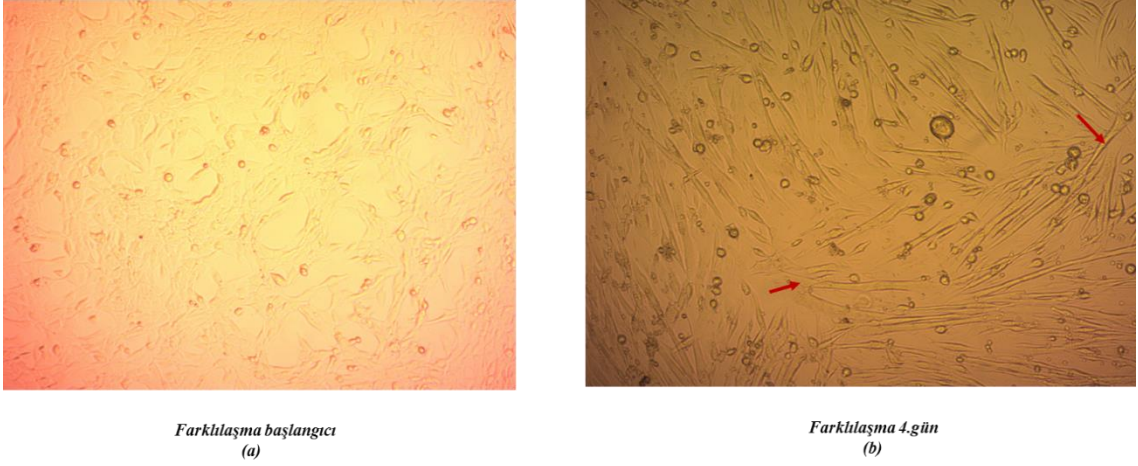
EE ve BE'nin total polifenol (TP) miktarları, Cheng ve ark.'ları (2012) tarafından optimize edilen Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Singleton ve ark., 1965). Gallik asit eş değeri olarak verilen TP konsantrasyonları, 3 tekrarlı deneyin ortalamasını (\pm standart hata) göstermektedir (Şekil 4.1). BE'de ölçülen TP değerinin 17,4 mg/100 mg gallik asit eşdeğeri olduğu; EE için ise bu değer 11,5 mg/100 mg olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.1. Karabaş otu sulu demlemesinden elde edilen EE ve BE'nin total polifenol miktarları

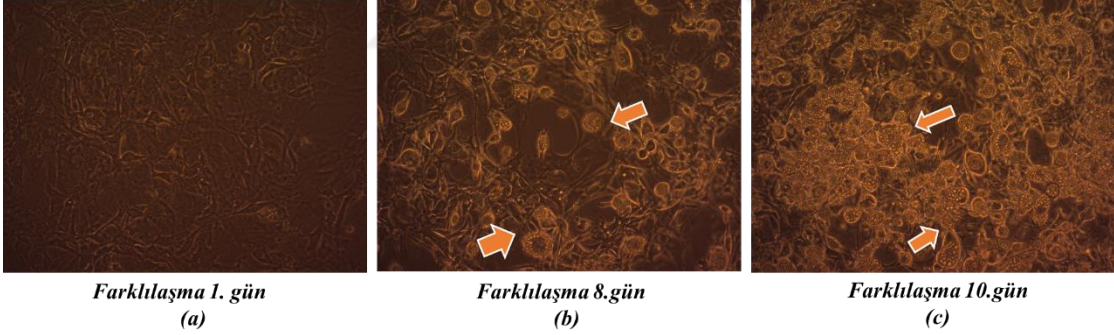
4.1.1.2. C2C12 ve 3T3L1 Hücrelerinin Farklaştırılması

Miyoblastların kültür plakasını tamamen kaplamalarının ardından (3 gün), farklılaşma besiyeri (% 2 at serumu içeren DMEM) içerisinde 4 gün boyunca miyotüplere farklılaşması sağlanmıştır. 4. günün sonunda farklılaşan miyotüpler Şekil 4.2' de görülmektedir (100X büyütme). Şekilde belirtilen, a) yüzeyi tamamen kaplayan miyoblast hücrelerini, b) tamamen farklılaşmış miyotüpleri ifade etmektedir.



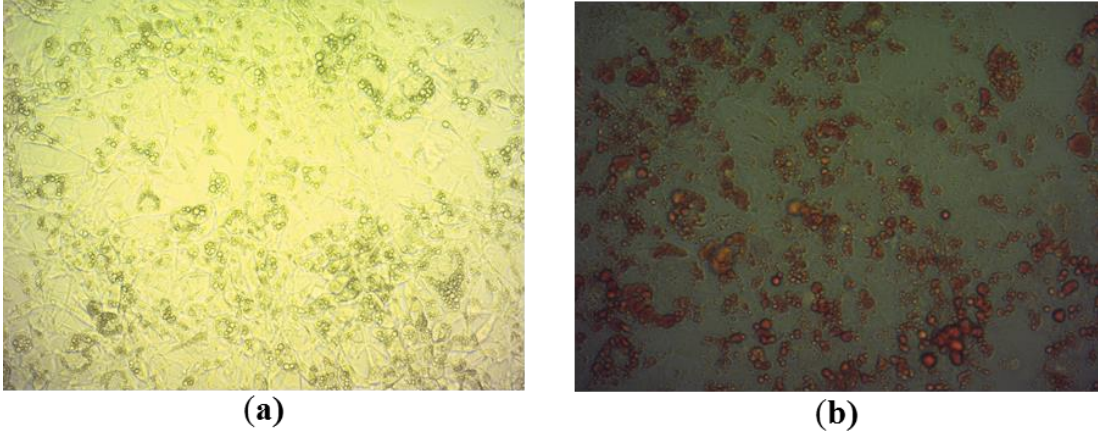
Şekil 4.2. C2C12 miyoblastlarının farklılaşarak miyotüplere dönüşümü

3T3L1 preadiposit hücrelerinin adipositlere dönüşümü (1., 8., ve 10.gün) ve farklılaşan adipositlerdeki yuvarlak kesecikler halinde gözlemlenen lipid akümüasyonu Şekil 4.3' de verilmiştir (100X büyütme). Şekil 4.3'de belirtilen, a) farklılaşma başlangıcında preadipositlerin 1.günü, b) farklılaşmanın 8.günü, c) 10.gün'de farklılaşmış adipositleri ifade etmektedir.



Şekil 4.3. 3T3L1 fare preadiposit hücrelerinin farklılaşarak adipositlere dönüşümü

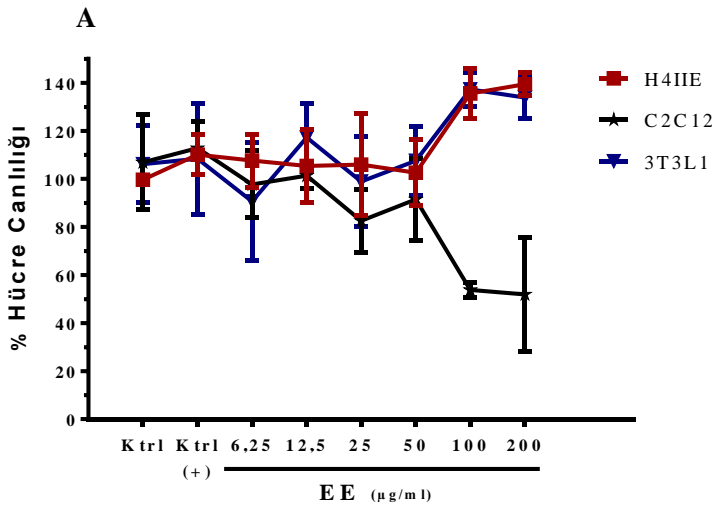
Farklılaşan 3T3L1 adiposit hücrelerinde Oil red O ile boyanan yağ kesecikler adipojenezisin gerçekleştiğini doğrulamaktadır (200X büyütme), (Şekil 4.4). Şekil 4.4'de belirtilen a) boyama öncesi, b) boyama sonrası hücreleri ifade etmektedir.



Şekil 4.4. Adipositlere farklılaşan 3T3L1 hücrelerinde lipit birikiminin Oil red O boyama ile doğrulanması

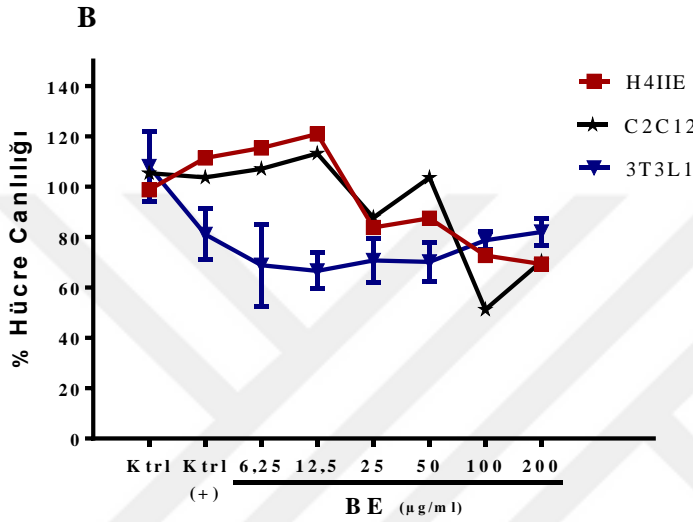
4.1.1.3. Hücre Canlılığı Sonuçları

Ekstratların hücre canlılığı üzerine etkileri MTT analizi ile değerlendirilmiştir. H4IIE ve 3T3L1 hücrelerinde EE 6,25-12.5-25-50-100-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozlarda hücre canlılığını % 85-147 arası oranlarda etkilemiştir. Bu sonuçlar EE'nin uygulanan bütün konsantrasyonlarının bu hücre hatları için toksik olmadığını göstermektedir. C2C12 hücrelerinde ise, 6,25-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ arası dozlarda hücre canlılığının % 80'nin üzerinde olduğu görülürken, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve üzeri dozlarda canlılığın % 80' nin altına düştüğü görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Karabaş otundan elde edilen EE'nin H4IIE, C2C12 ve 3T3L1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri

H4IIE ve C2C12 hücrelerine 6,25-12,5-25-50-100-200 µg/mL dozlarda ekstrat uygulamaları yapılmıştır. BE'nin 50 µg/mL doza kadar yapılan uygulamalarında hücre canlılığı % 80' nin üzerindedir. 3T3L1 hücrelerine BE'nin belirtilen dozları uygulandığında ise, hücre canlılığının % 65-90 aralığında olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Bu sonuçlara göre, her iki ekstratın 25 ve 50 µg/mL dozları güvenli ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

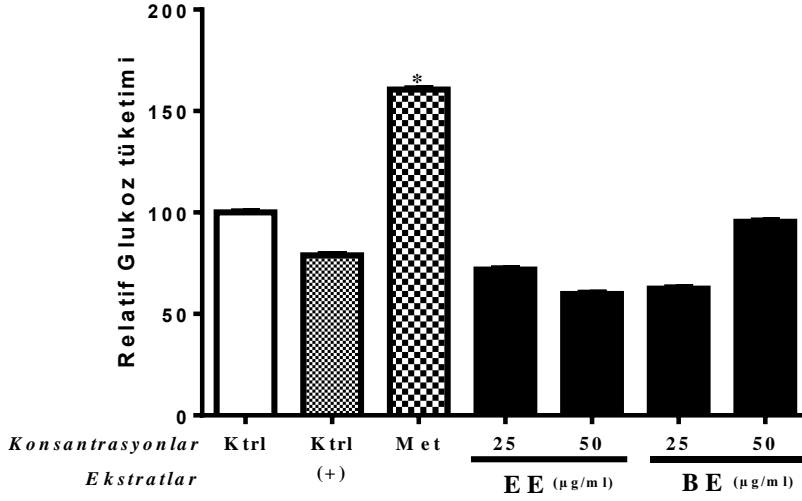


Şekil 4.6. Karabaş otundan elde edilen BE'nin H4IIE, C2C12 ve 3T3L1 hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri

4.1.1.4. Ekstratlar ile Gerçekleştirilen Fizyolojik Etki Çalışmaları

4.1.1.4.1. Ekstratların H4IIE Hücrelerinde Glukoz Tüketimi Üzerine Etkileri

Şekil 4.7 'de verilen sonuçlara göre, H4IIE hücrelerindeki glukoz tüketimi kontrol ve çözücü kontrol grubunda sırasıyla 0,91 ve 0,71 mM bulunmuştur. Pozitif kontrol olarak kullanılan metforminin (2 mM) uygulandığı hücrelerde glukoz tüketiminin kontrole kıyasla % 80 oranında arttığı görülmüştür ($p < 0,05$). EE ve BE'nin 25 ve 50 µg/mL dozlarının uygulanmasıyla glukoz tüketim seviyelerinin kontrole benzer seviyelerde olduğu, anlamlı bir değişiklik yaratmadığı gözlemlenmiştir. Uygulama grupları, (-) kontrol, (+) çözücü kontrol, EE-25 µg/mL, EE-50 µg/mL, BE 25 µg/mL, BE-50 µg/mL şeklindedir. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır.

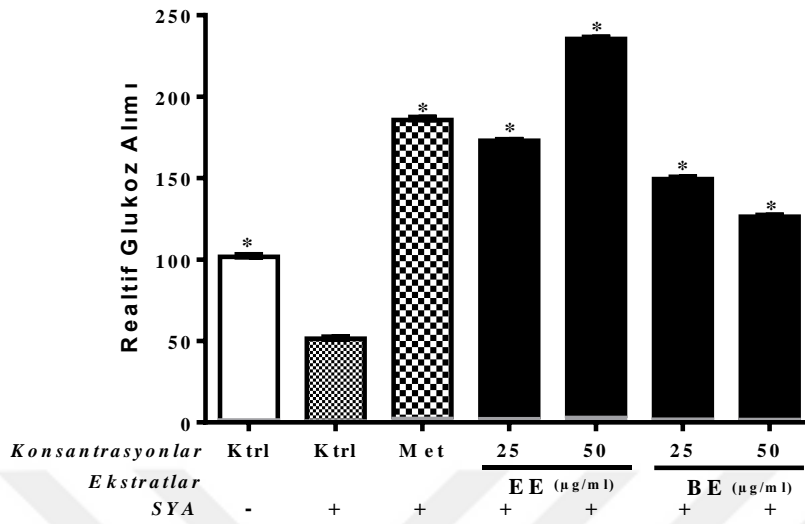


Şekil 4.7. EE ve BE'nin H4IIE hücrelerinde glukoz tüketimi üzerine etkileri. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$).

4.1.1.4.2. Ekstratların İnsülin Direnci Geliştirilen C2C12 Miyotüplerinde Glukoz Alımı Üzerine Etkileri

Bu analizde, (+) SYA kontrol grubundaki glukoz alımının, (-) SYA grubundaki glukoz alımına göre % 50 oranında düşük olması (Şekil 4.8), uygulanan protokolün C2C12 hücrelerinde insülin direncini başarılı bir şekilde oluşturduğunu göstermektedir. (+) SYA gruplarında gelişen insülin direnci ayrıca aşağıda ayrıntılı şekilde anlattığımız Western blot analizleri ile de (özellikle p-AKTSer473 protein seviyesindeki önemli azalma ile) doğrulanmıştır. Şekil 4.8' de görüldüğü üzere, pozitif kontrol olarak uyguladığımız metformin insülin direnci geliştirilen hücrelerde glukoz alımını (+) SYA kontrol grubuna göre % 132 oranında artırmıştır. EE ve BE uygulamalarıyla hücre içine alınan glukoz konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı önemli artışlar tespit edilmiştir. Buna göre, (+) SYA kontrol grubuna kıyasla, BE 25 ve 50 µg/mL dozlarında glukoz alımını sırasıyla % 97 ve % 78 oranlarında artırırken, aynı dozlarda EE için bu artışların % 120 ve % 182 oranlarında olduğu bulunmuştur. EE uygulamasından elde edilen bu oranlar pozitif kontrol olan metformine yakın (% 132 metformin için, % 120 EE için) bulunmuştur. Hatta 50 µg/mL EE dozunda bu oran metforminin de üzerinde (EE: % 182) bulunmuştur. Şekil 4.8'de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları (-) SYA Kontrol, (+) SYA Kontrol, (+) SYA-EE-25 µg/mL, (+) SYA-EE-50 µg/mL, (+) SYA-BE 25 µg/mL, (+) SYA-BE-50 µg/mL şeklindedir. Her bir

uygulama triplike olarak yapılmıştır.

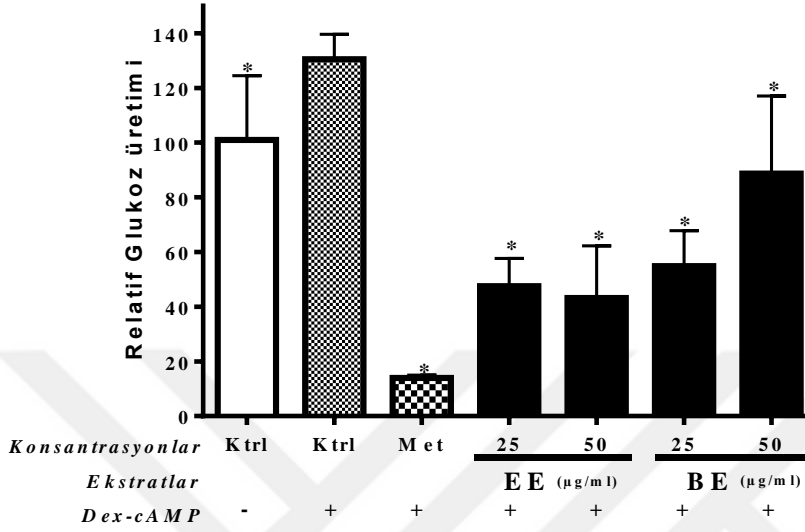


Şekil 4.8. EE ve BE'nin serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 miyotüplerindeki glukoz alımı üzerine etkileri. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

4.1.1.4.3. Ekstratların H4IIE Hücrelerinde Glukoneojenik Glukoz Üretimi Üzerine Etkileri

Karabaş otundan elde edilen EE ve BE'nin karaciğerdeki glukoneojenik glukoz üretimini baskılama potansiyelleri değerlendirilmiştir. Şekil 4.9'a baktığımızda (-) Dex-cAMP yani glukoneojenezin indüklenmediği besiyerine kıyasla, (+) Dex-cAMP kontrol besiyerindeki glukoz konsantrasyonunun % 30 oranında artması, glukoneojenezin başarılı bir şekilde indüklendiğini göstermektedir. Glukoneojenezin indüklendiği hücrelerde 2 mM dozda uygulanan metforminin ise, artan glukoz üretimini % 116 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Pozitif kontrol için bulunan bu oran literatürde verilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir (Waterman ve ark., 2015). Metformine benzer olarak, EE'nin 25 ve 50 µg/mL dozlarında uygulamasının, (+) Dex-cAMP kontrol grubuna kıyasla glukoz üretimini sırasıyla % 82 ve % 87 oranlarında, BE'nin ise aynı dozlarda sırasıyla % 75 ve % 42 oranlarında azalttığı görülmüştür ($p < 0,05$). Buna göre, glukoneojenik glukoz üretimini baskılama açısından en etkin ekstratın pozitif kontrole (metformin) en yakın değerleri veren EE olduğu görülmektedir. Şekil 4.9'da belirtilen, (+) Dex-cAMP glukoneojenezin indüklendiği besiyerini, (-) Dex-cAMP yalnızca DMEM besiyerini ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) Dex-cAMP kontrol, (+) Dex-cAMP kontrol, pozitif kontrol

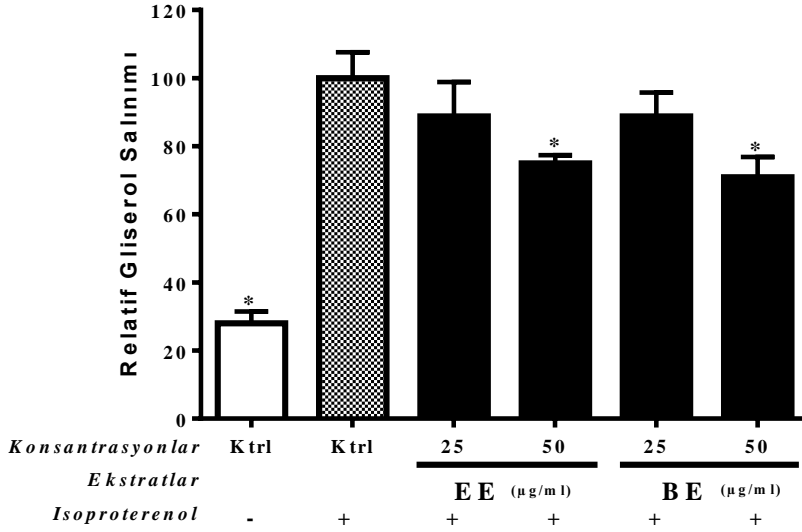
metformin: 2 mM, EE 25 µg/mL, EE 50 µg/mL, BE 25 µg/mL, BE 50 µg/mL şeklindedir. Besiyerlerinde ölçülen glukoz konsantrasyonları protein miktarlarına göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) Dex-cAMP kontrol değeri % 100 olarak alınmıştır.



Şekil 4.9. EE ve BE'nin H4IIE hücrelerinde glukoneojenik glukoz üretimi üzerine etkileri. *(+) Dex-cAMP kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

4.1.1.4.4. Ekstratların 3T3L1 Hücrelerinde Gliserol Salınımı Üzerine Etkileri

EE ve BE'nin 25 ve 50 µg/mL dozlarının 3T3L1 hücrelerinde gliserol salınımı üzerine etkileri Şekil 4.10'da verilmiştir. Buna göre, 100 nM dozda isoproterenol uygulamasıyla % 72 oranında indüklenen gliserol salınımını; EE'nin 25 ve 50 µg/mL dozları sırasıyla % 11 ve % 55 (p<0,05), BE'nin 25 ve 50 µg/mL dozları sırasıyla % 11 ve % 29 (p<0,05) oranlarında baskıladığı görülmüştür. Uygulama grupları, kontrol, indüklenmiş kontrol (100 nM isoproterenol), isoproterenol ile birlikte uygulanan EE 25 µg/mL, EE 50 µg/mL, BE 25 µg/mL, BE 50 µg/mL şeklindedir. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır. İndüklenmiş kontrol değeri % 100 olarak alınmıştır.



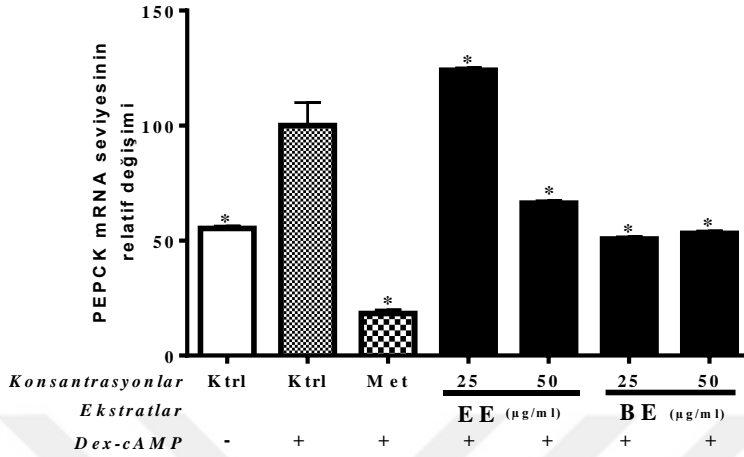
Şekil 4.10. EE ve BE'nin 3T3L1 hücrelerinde gliserol salınımı üzerine etkileri. *İndüklenmiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

4.1.1.5. Ekstratların Hedef Yolaklardaki Gen ve Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

4.1.1.5.1. Ekstratların H4IIE Hücrelerinde PEPCK ve G6Paz Gen Ekspresyonları Üzerine Etkileri

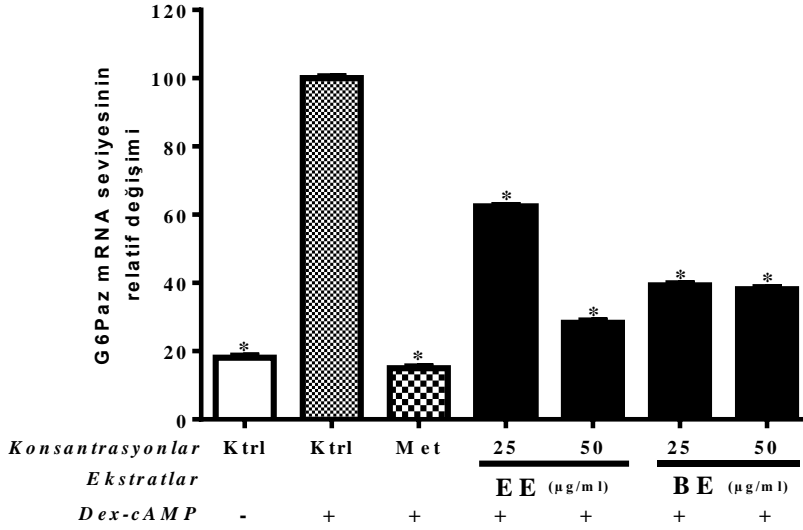
EE ve BE'nin glukoneojenez yolağında düzenleyici rol oynayan PEPCK ve G6Paz genlerinin mRNA seviyeleri üzerine etkileri Real time-PCR analizi ile belirlenmiştir. EE ve BE'nin PEPCK gen ekspresyon seviyesine olan etkisi Şekil 4.11' de verilmektedir. Buna göre, (+) Dex-cAMP kontrol hücrelerindeki PEPCK ekspresyon seviyesinin, (-) Dex-cAMP kontrole kıyasla % 74 oranında artması glukoneojenezin bu hücrelerde başarılı bir şekilde indüklendiğini göstermektedir. Pozitif kontrol olarak kullanılan metformin (2 mM dozda) glukoneojenezin indüklendiği hücrelerde PEPCK ekspresyonunu % 82 oranında azaltarak indüklenme yapılmamış hücrelerdeki kontrol seviyelerine çekmiştir. BE'nin 25 ve 50 µg/mL dozları indüklenen PEPCK ekspresyon seviyesini % 49-47 oranında azaltırken, 50 µg/mL dozundaki EE % 34 oranında baskılamıştır (p<0,05). Şekil 4.11'de belirtilen, (+) Dex-cAMP glukoneojenezin indüklendiği besiyerini, (-) Dex-cAMP yalnızca DMEM besiyerini ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) Dex-cAMP kontrol, (+) Dex-cAMP kontrol, Dex-cAMP ile birlikte uygulanan EE-25 µg/mL, EE-50 µg/mL, BE-25 µg/mL, BE-50 µg/mL, pozitif kontrol metformin 2 mM şeklindedir. PEPCK gen

ekspresyon seviyesi β -aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (+) Dex-cAMP kontrol değeri %100 olarak alınmıştır. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır.



Şekil 4.11. EE ve BE'nin H4IIE hücrelerinde PEPCK gen ekspresyon seviyesine etkileri. *(+) Dex-cAMP kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

EE ve BE'nin G6Paz gen ekspresyon seviyesine olan etkisi Şekil 4.12' de verilmektedir. Buna göre, (+) Dex-cAMP kontrol hücrelerindeki G6Paz gen ekspresyon seviyesi, (-) Dex-cAMP kontrole kıyasla % 82 oranında artmıştır. (+) Dex-cAMP grubunda her iki enzimin (PEPCK ve G6Paz) gen seviyelerinde görülen artışlar, glukoneojenezin indüklendiğini açık şekilde göstermektedir. Pozitif kontrol olarak kullanılan metformin (2 mM dozda) glukoneojenezin indüklendiği hücrelerde G6Paz ekspresyonunu % 86 oranında azaltarak indüklemeye yapılmamış kontrol hücrelerindeki seviyelere çekmiştir. BE'nin 25 ve 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozları indüklenen G6Paz ekspresyon seviyesini % 60-62 oranında düşürmüştür. EE ise indüklenen G6Paz seviyesini doza bağımlı bir şekilde 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozda % 37 oranında azaltırken, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozda, metformine yakın bir seviyede % 71 oranında baskılamıştır. Şekil 4.12'de verilen, (+) Dex-cAMP glukoneojenezin indüklendiği besiyerini, (-) Dex-cAMP, yalnızca DMEM besiyerini ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) Dex-cAMP kontrol, (+) Dex-cAMP kontrol, EE-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Dex-cAMP ile birlikte uygulanan EE-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BE-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BE-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, metformin: 2 mM-pozitif kontrol şeklindedir. G6Paz gen ekspresyon seviyesi β -aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (+) Dex-cAMP kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır.



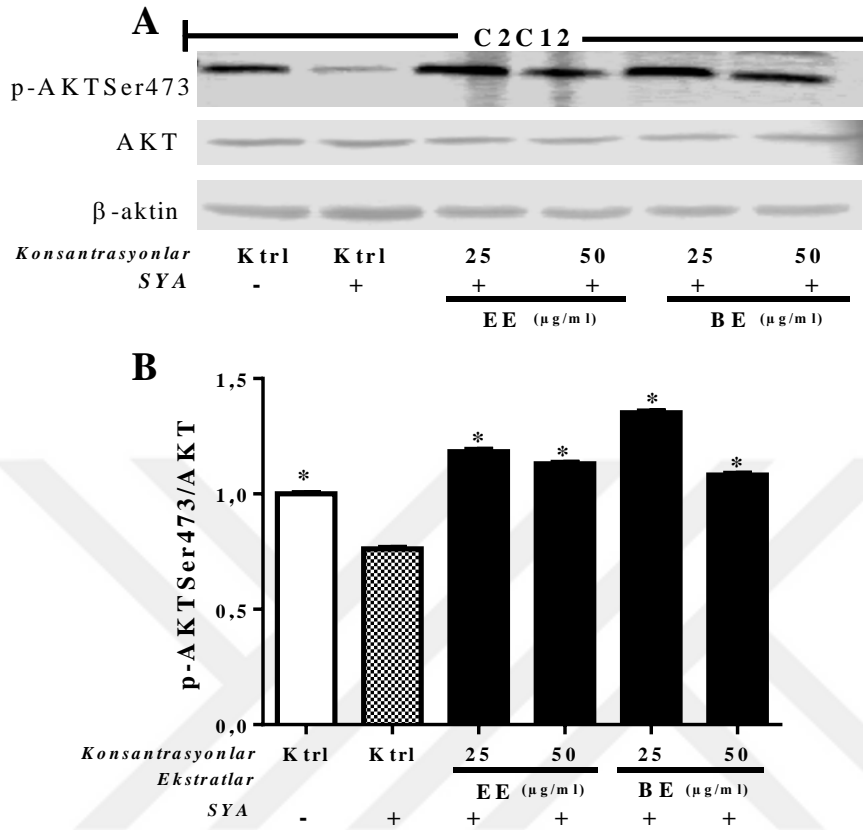
Şekil 4.12. EE ve BE'nin H4IIE hücrelerinde G6Paz gen ekspresyon seviyesine etkileri. *(+) Dex-cAMP kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

4.1.1.5.2. Ekstratların İnsülin Direnci Geliştirilen C2C12 Miyotüplerinde İnsülin Sinyalizasyonunda Rol Oynayan Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkileri

İnsülin direnci modelinin hücrelerde etkin bir şekilde oluşturulduğunu göstermek için p-AKTSer473 seviyesinin azalması biyomarkör olarak kullanılmaktadır (Hirabara, 2012). Bu nedenle, protein analizlerinde ilk olarak p-AKT seviyesi kontrol edilerek, insülin direnci oluşup oluşmadığının doğrulaması yapılmıştır. İnsülin direnci modelinin oluşturulmasının ardından diğer proteinlerle olan çalışmalara devam edilmiştir.

Western blot çalışmaları sonucu yapılan densitometrik analizler, p-AKTSer473/AKT oranının SYA ile insülin direnci geliştirilen C2C12 hücrelerinde (-) SYA grubuna kıyasla % 24 oranında azaldığını göstermiştir. Azalan bu p-AKTSer473/AKT seviyesi, (+) SYA besiyeri içerisinde uygulanan EE'nin 25 ve 50 µg/mL dozlarında sırasıyla % 43 ve % 37 oranında, BE'nin 25 ve 50 µg/mL dozlarında ise sırasıyla % 59 ve % 32 oranlarında artmıştır (Şekil 4.13). Şekil 4.13'de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-EE-25 µg/mL, (+) SYA-EE-50 µg/mL, (+) SYA-BE-25 µg/mL, (+) SYA-BE-50 µg/mL şeklindedir. p-AKTSer473 ve AKT protein seviyeleri β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image

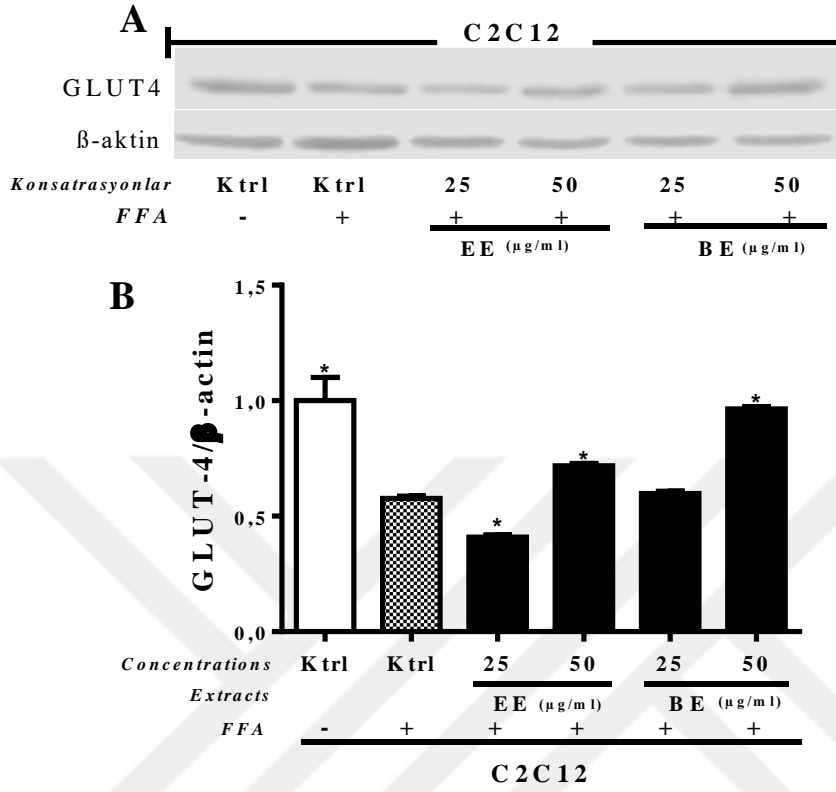
software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.13. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki p-AKT Ser473/AKT proteinlerinin seviyeleri üzerine etkileri. (B) p-AKT Ser473/AKT protein seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

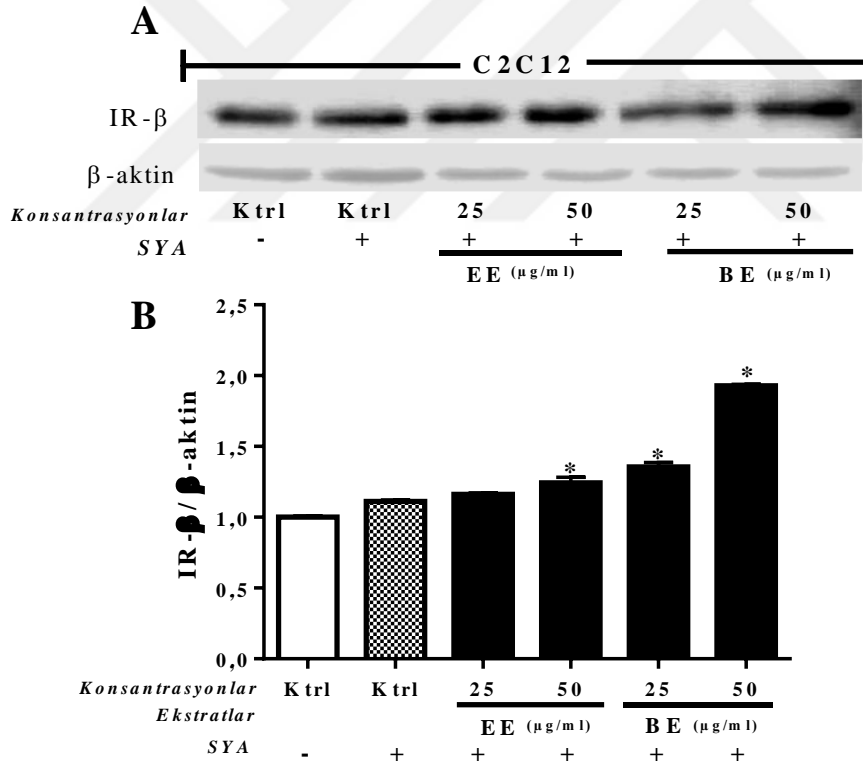
SYA ile insülin direnci geliştirilen C2C12 hücrelerinde GLUT-4 seviyesinin (-) SYA grubuna kıyasla % 43 oranında azaldığı görülmüştür. Azalan GLUT-4 seviyesi, (+) SYA besiyeri içerisinde uygulanan EE ve BE'nin 25 μ g/mL dozunda bir artış göstermezken, 50 μ g/mL dozlarında sırasıyla % 14 ve % 40 oranında artmıştır (Şekil 4.14). Şekil 4.14'de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-EE-25 μ g/mL, (+) SYA-EE-50 μ g/mL, (+) SYA-BE-25 μ g/mL, (+) SYA-BE-50 μ g/mL şeklindedir. GLUT-4 protein seviyeleri β -aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol

değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



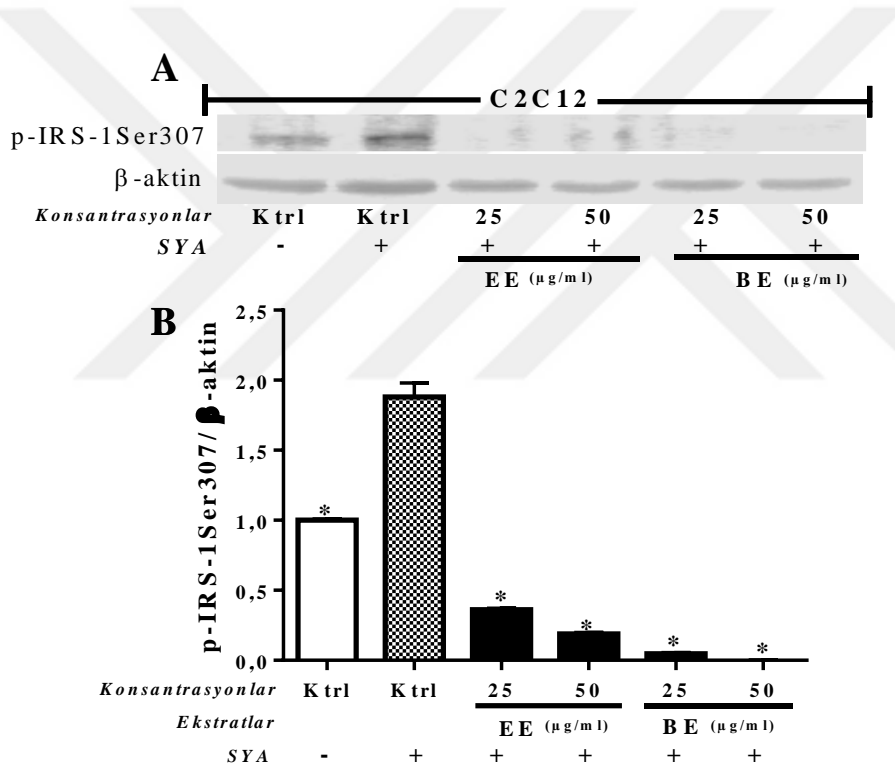
Şekil 4.14. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki GLUT-4 proteinlerinin seviyeleri üzerine etkileri. (B) GLUT-4 protein seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

İnsülin reseptör beta proteinini (IR- β) için yapılan Western blot analizlerinde, (-) SYA ve (+) SYA kontrol grupları arasında protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmemektedir. EE uygulaması 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ dozlarda IR- β protein seviyesini (+) SYA kontrol grubuna kıyasla % 5 ve % 13 oranında artırırken, BE uygulamasının 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ dozları bu proteinin seviyesini sırasıyla % 24 ve % 81 oranlarında artırdığı görülmüştür (Şekil 4.15). Şekil 4.15’de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-EE-25 $\mu\text{g/mL}$, (+) SYA-EE-50 $\mu\text{g/mL}$, (+) SYA-BE-25 $\mu\text{g/mL}$, (+) SYA-BE-50 $\mu\text{g/mL}$ şeklindedir. IR- β protein seviyesi β -aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.15. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki IR- β protein seviyesi üzerine etkileri. (B) IR- β protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

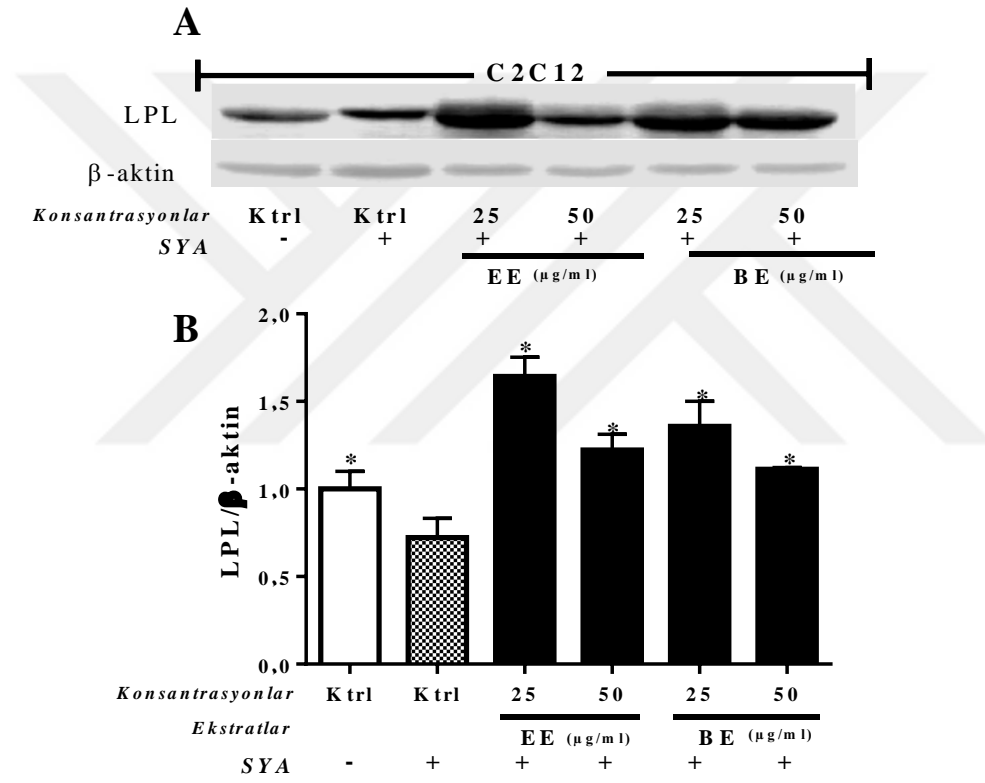
p-IRS-1Ser307 protein seviyesi, SYA ile insülin direnci geliştirilen C2C12 hücrelerinde (-) SYA grubuna kıyasla % 87 oranında artmıştır. (+) SYA kontrol grubunda artan p-IRS-1 Ser 307 proteinin seviyesi, EE ve BE'nin 25 ve 50 µg/mL dozlarında (-) SYA' dan daha düşük seviyelere çekilmiştir (Şekil 4.16). Şekil 4.16'da belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları; (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-EE-25 µg/mL, (+) SYA-EE-50 µg/mL, (+) SYA-BE-25 µg/mL, (+) SYA-BE-50 µg/mL şeklindedir. p-IRS-1Ser307 protein seviyesi β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.16. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki p-IRS-1 Ser 307 protein seviyesi üzerine etkileri. (B) p-IRS-1Ser307 protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

Protein seviyesindeki değişimlere bakılan bir diğer parametre lipoprotein lipaz (LPL) enzimidir. Serbest yağ asidi uygulamasıyla insülin direnci geliştirilen C2C12 hücrelerinde, (-) SYA grubuna kıyasla, LPL seviyesinin % 27 oranında azalması beklenen bir sonuçtur

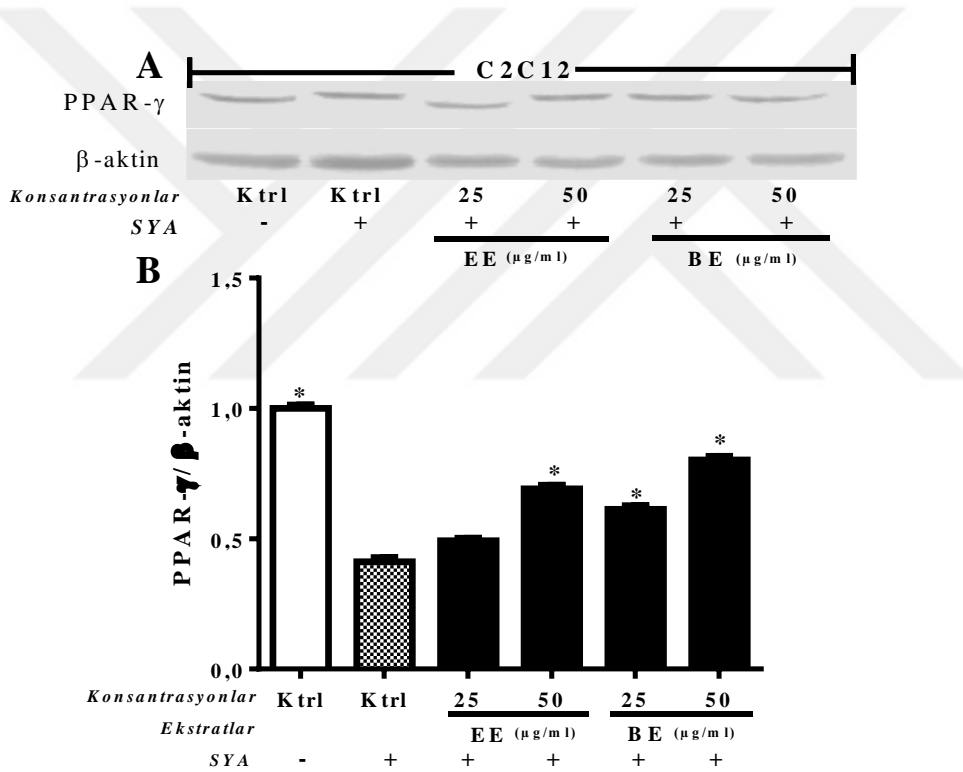
İnsülin direnci geliştirilen hücelere uygulanan EE ve BE'nin 25-50 µg/mL dozlarının azalan LPL seviyesini sırasıyla % 92-50 ve % 66-38 oranlarında artırmıştır (Şekil 4.17). Şekil 4.17'de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hüceleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-EE-25 µg/mL, (+) SYA-EE-50 µg/mL, (+) SYA-BE-25 µg/mL, (+) SYA-BE-50 µg/mL şeklindedir. LPL protein seviyesi β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.17. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki LPL protein seviyesi üzerine etkileri. (B) LPL protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

Yapılan densitometrik analizler, PPAR-γ seviyesinin SYA ile insülin direnci geliştirilen C2C12 hücrelerinde (-) SYA kontrol grubuna kıyasla % 57 oranında azaldığını göstermiştir. Azalan PPAR-γ seviyesi, (+) SYA besiyeri içerisinde uygulanan EE'nin 25 µg/mL dozunda anlamlı derecede değişmezken, 50 µg/mL dozunda % 27, BE'nin 25 ve

50 µg/mL dozlarında ise sırasıyla % 19 ve % 38 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (Şekil 4.18). Verilere bakıldığında, çalışmaların devamı için seçilen EE'nin 50 µg/mL dozunda görülen anlamlı artış, bu fraksiyonun içeriğinde PPAR-γ agonisti olabilecek bileşiklerin var olduğunu göstermektedir. Şekil 4.18'de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-EE-25 µg/mL, (+) SYA-EE-50 µg/mL, (+) SYA-BE-25 µg/mL, (+) SYA-BE-50 µg/mL şeklindedir. PPAR-γ protein seviyesi β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.

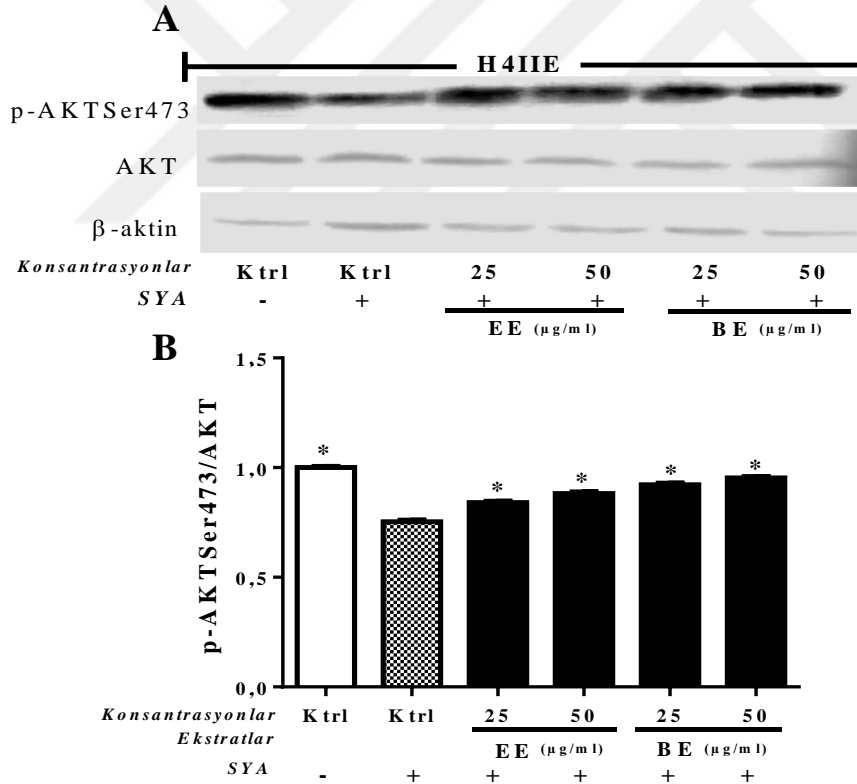


Şekil 4.18. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki PPAR-γ protein seviyesi üzerine etkileri. (B) PPAR-γ protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatikselsel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

4.1.1.5.3. Ekstratların İnsülin Direnci Geliştirilen H4IIE Hücrelerinde İnsülin Sinyalizasyonunda Rol Oynayan Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkileri

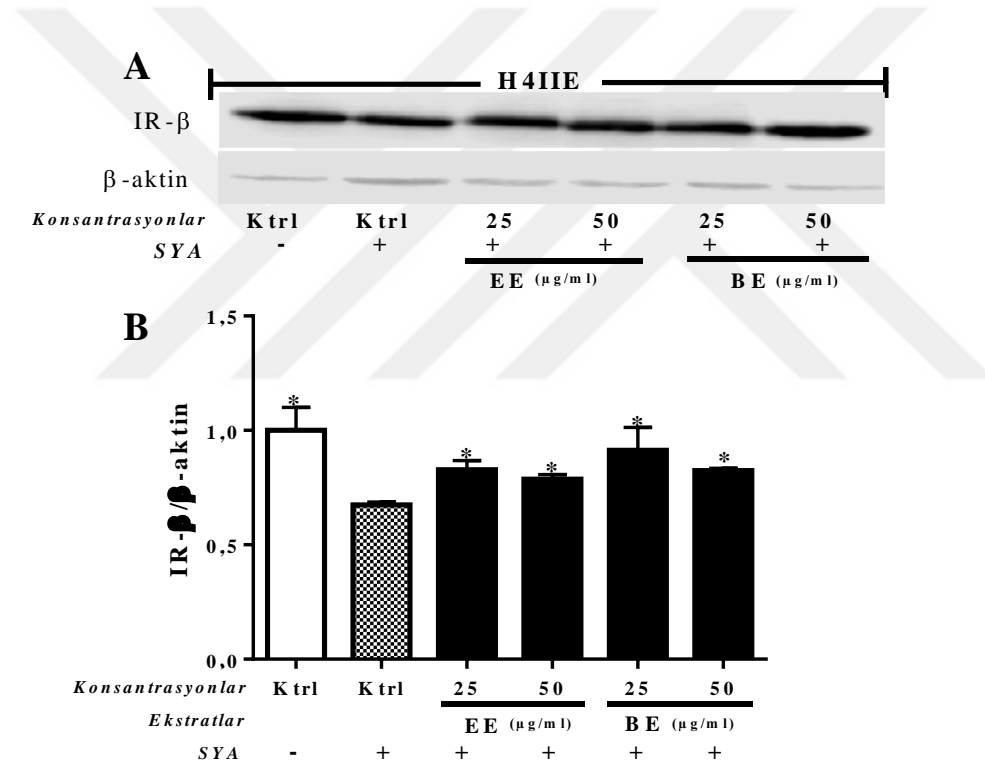
Western blot çalışmaları sonucu yapılan densitometrik analizler, SYA ile insülin

direnci geliştirilen H4IIE hücrelerinde (-) SYA grubuna kıyasla p-AKTSer473/AKT oranının % 27 oranında azaldığını göstermiştir. Bu sonuç, H4IIE hücrelerinde insülin direnci oluştuğunu göstermektedir. İnsülin direnci sonucu azalan p-AKTSer473/AKT oranını, EE'nin 25 ve 50 µg/mL dozları sırasıyla % 8 ve % 13, BE'nin 25 ve 50 µg/mL dozları ise sırasıyla % 17 ve % 20 oranlarında artırmıştır (Şekil 4.19). Şekil 4.19'da belirtilen, (-) SYA kontrol, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-EE-25 µg/mL, (+) SYA-EE-50 µg/mL, (+) SYA-BE-25 µg/mL, (+) SYA-BE-50 µg/mL şeklindedir. p-AKTSer473 ve AKT protein seviyeleri β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.19. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hepatoma hücrelerindeki p-AKTSer473/AKT oranı üzerine etkileri. (B) p-AKTSer473/AKT seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

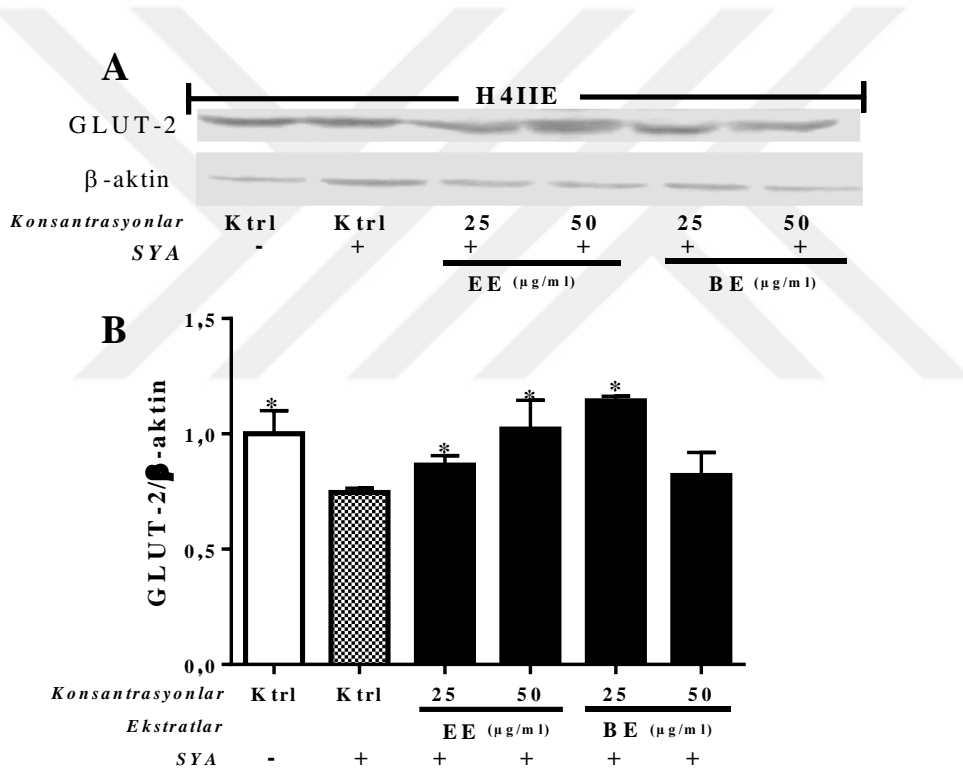
IR- β protein seviyesi SYA ile insülin direnci geliştirilen H4IIE hücrelerinde (-) SYA grubuna kıyasla % 30 oranında azalmıştır. İnsülin direncinde azalan protein seviyesi EE'nin 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ dozlarında sırasıyla % 15 ve % 11, BE'nin 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ dozlarında ise sırasıyla % 24 ve % 15 oranlarında artmıştır (Şekil 4.20). Şekil 4.20'de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-EE-25 $\mu\text{g/mL}$, (+) SYA-EE-50 $\mu\text{g/mL}$, (+) SYA-BE-25 $\mu\text{g/mL}$, (+) SYA-BE-50 $\mu\text{g/mL}$ şeklindedir. IR- β protein seviyesi β -aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.20. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hepatoma hücrelerindeki IR- β protein seviyesi üzerine etkileri. (B) IR- β protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

SYA ile insülin direnci geliştirilen H4IIE hücrelerinde insülin sinyalizasyon yolağında downstream yolağında yer alan GLUT2 protein seviyesinin (-) SYA grubuna kıyasla % 25 oranında azaldığı görülmüştür. İnsülin direncine bağımlı olarak azalan

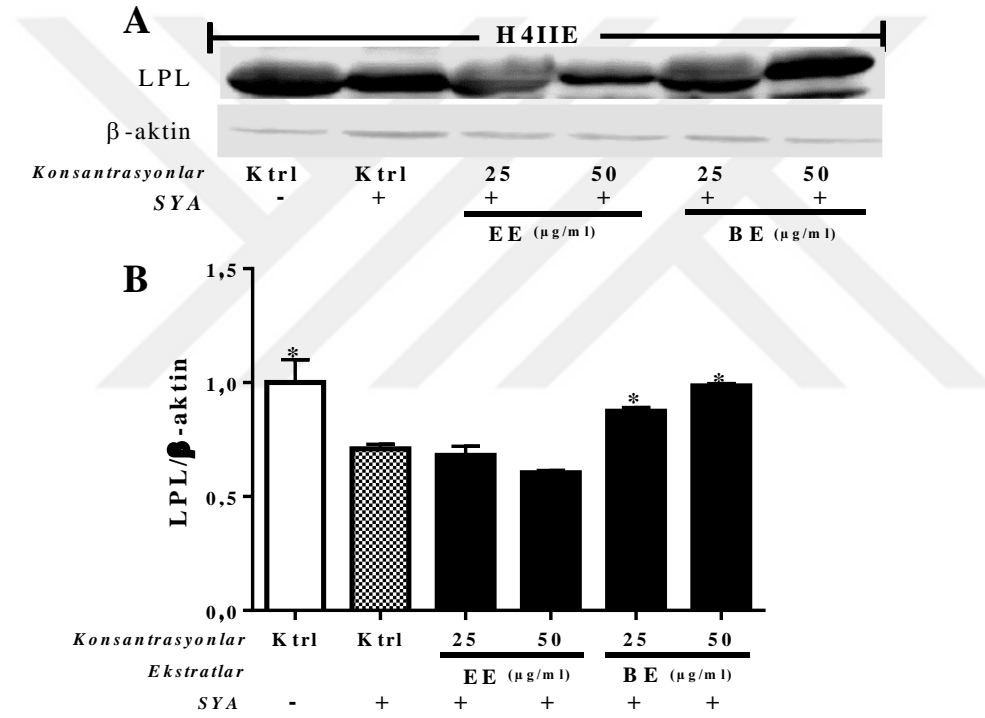
GLUT2 protein seviyesi EE'nin 25 ve 50 µg/mL dozlarında uygulanmasıyla sırasıyla % 12 ve % 26 oranında artmıştır. Benzer şekilde, BE'nin 25 ve 50 µg/mL dozları, insülin direnci ile azalan GLUT2 seviyesini sırasıyla % 40 ve % 7 oranlarında artırmıştır (Şekil 4.21). Şekil 4.21'de belirtilen (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-EE-25 µg/mL, (+) SYA-EE-50 µg/mL, (+) SYA-BE-25 µg/mL, (+) SYA-BE-50 µg/mL şeklindedir. GLUT-2 protein seviyesi β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.21. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hepatoma hücrelerindeki GLUT-2 protein seviyesi üzerine etkileri. (B) GLUT-2 protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

LPL seviyesi SYA ile insülin direnci geliştirilen H4IIE hücrelerinde (-) SYA grubuna kıyasla % 30 oranında azalmıştır. Daha öncede belirttiğimiz gibi insülin etkisiyle seviyesinde artış görülen bu proteinin, insülin direnci gelişimi sonucu azalması beklenen

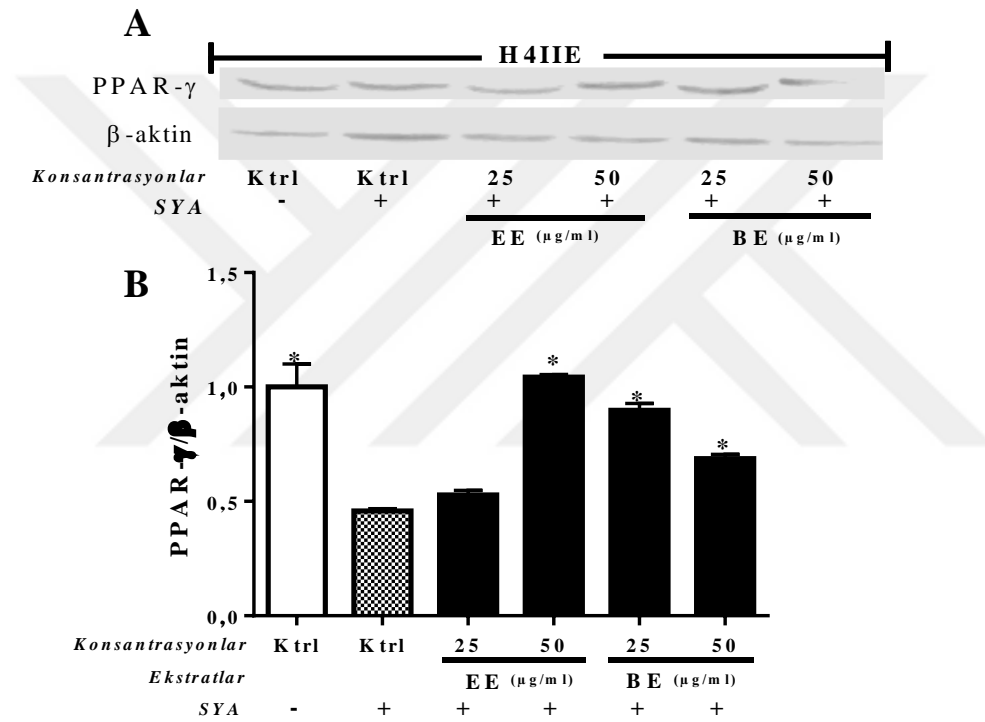
bir yanıttır. İnsülin direnci ile azalan LPL seviyesi EE'nin 25 ve 50 µg/mL dozlarında anlamlı şekilde değişmezken, BE'nin 25 ve 50 µg/mL dozlarında sırasıyla % 16 ve % 28 oranlarında artırmıştır (Şekil 4.22). Şekil 4.22'de belirtilen, (-) SYA kontrol, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-EE-25 µg/mL, (+) SYA-EE-50 µg/mL, (+) SYA-BE-25 µg/mL, (+) SYA-BE-50 µg/mL şeklindedir. LPL protein seviyesi β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.22. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hücrelerindeki LPL protein seviyesi üzerine etkileri. (B) LPL protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

PPAR- γ 'nın seviyesi, SYA ile insülin direnci geliştirilen H4IIE hücrelerinde (-) SYA kontrol grubuna kıyasla % 54 oranında anlamlı derecede azalmıştır. Azalan PPAR- γ protein seviyesini (+) SYA besiyeri içerisinde uygulanan EE'nin 25 µg/mL dozu anlamlı şekilde değiştirmezken, 50 µg/mL dozu % 59 oranında, BE'nin 25 ve 50 µg/mL dozları ise

sırasıyla % 44 ve % 23 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır (Şekil 4.23). Şekil 4.23’de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-EE-25 µg/mL, (+) SYA-EE-50 µg/mL, (+) SYA-BE-25 µg/mL, (+) SYA-BE-50 µg/mL şeklindedir. PPAR-γ protein seviyesi β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.23. EE ve BE'nin (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hepatoma hücrelerindeki PPAR-γ protein seviyesi üzerine etkileri. (B) PPAR-γ protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

Ekstratlarla gerçekleştirilen ve yukarıda verilen sonuçlar EE'nin hedeflenen spesifik etkiyi gösterme konusunda daha aktif ve daha doza bağımlı bir eğilime sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle EE en aktif ekstrat olarak seçilmiş ve biyoaktivite rehberli fraksiyonlama çalışmalarına bu ekstrat üzerinden devam edilmiştir.

4.1.2. Biyoaktivite Rehberli Çalışmalar ile Aktif EE Fraksiyonlarının Belirlenmesi

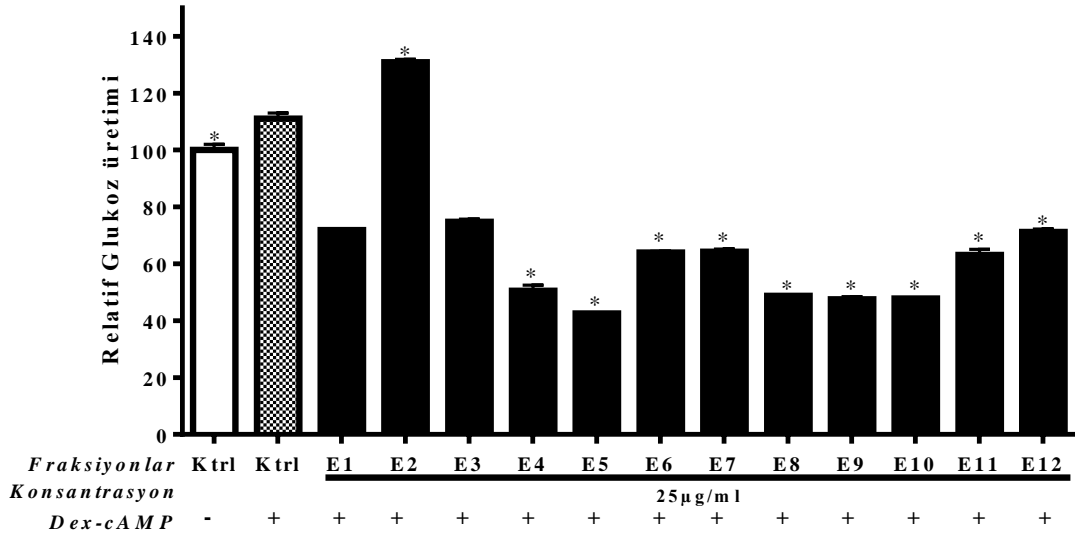
Ekstratlarla gerçekleştirilen biyoaktivite çalışmaları sonucu en aktif ekstrat olarak belirlenen EE kolon kromatografisi kullanılarak 12 alt fraksiyona (E1-E12) ayrılmıştır. Sonrasında elde edilen 12 alt fraksiyonun biyoaktiviteleri, 5 farklı parametre kullanılarak taranmıştır. Elde edilen fraksiyonların adlandırılması Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. EE fraksiyonlarının adlandırılması

ETİL ASETAT FRAKSİYONLARI	
E1: 1-5. Fraksiyon	E7: 36-39. Fraksiyon
E2: 6-10. Fraksiyon	E8: 40-45. Fraksiyon
E3: 11-17. Fraksiyon	E9: 46-50. Fraksiyon
E4: 18-25. Fraksiyon	E10: 51-55. Fraksiyon
E5: 26-29. Fraksiyon	E11: 56-60. Fraksiyon
E6: 30-35. Fraksiyon	E12: 61-63. Fraksiyon

4.1.2.1. EE Fraksiyonlarının H4IIE Hepatoma Hücrelerinde Glukoneojenik Glukoz Üretimi Üzerine Etkileri

E1-E12 fraksiyonlarının H4IIE hepatoma hücrelerinde glukoneojenik glukoz üretimi üzerine etkileri 25 µg/mL dozda taranmıştır. Buna göre, glukoneojenezin indüklenmesiyle % 10 oranında artan glukoneojenik glukoz üretimi, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12 fraksiyonlarının uygulandığı hücrelerde sırasıyla % 61, % 69, % 47, % 47, % 62, % 64, % 63, % 48, % 40 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı ve oldukça etkili bir şekilde baskılanmıştır (Şekil 4.24). (+) Dex-cAMP glukoneojenezin indüklendiği besiyerini, (-) Dex-cAMP yalnızca DMEM besiyerini ifade etmektedir. (+) Dex-cAMP ile glukoneojenezin indüklendiği besiyerinde fraksiyonların 25 µg/ml dozlarının uygulaması yapılmıştır. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır. Glukoz konsantrasyonları, hücrelerin protein konsantrasyonlarına göre normalize edilmiştir. (-) Dex-cAMP kontrol değeri % 100 alınmıştır.



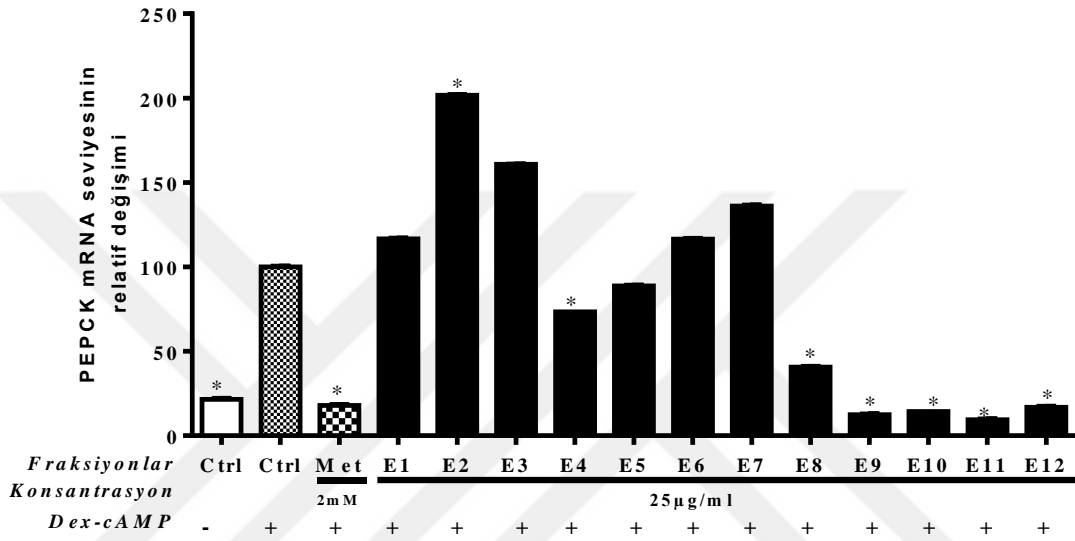
Şekil 4.24. E1-E12 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozunun H4IIE hücrelerinde glukoneojenik glukoz üretimi üzerine etkileri. *(+) Dex-cAMP kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

4.1.2.2. Fraksiyonların H4IIE Hücrelerinde Glukoneojenezde Rol Oynayan Hedef Genlerin Ekspresyon Seviyesi Üzerine Etkileri

EE alt fraksiyonlarının glukoneojenez yolağında düzenleyici rol oynayan PEPCK ve G6Paz genlerinin mRNA seviyeleri üzerine etkileri Real time-PCR analizi ile belirlenmiştir. Her gen için ayrı ayrı amplifikasyon analizi ile standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Amplifikasyon sonucunda elde edilen gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmalı ddCt metodu kullanılarak ve β-aktin Ct değerine karşı normalize edilerek hesaplanmıştır. (+) Dex-cAMP ddCt değeri kalibratör olarak kullanılmıştır.

Deney sonuçlarına göre, Dex-cAMP uygulaması, PEPCK ekspresyonunu (-) Dex-cAMP kontrole kıyasla % 78 oranında anlamlı şekilde artırarak bu hücrelerde glukoneojenezi başarılı bir şekilde indüklemiştir. Elde edilen verilere göre, E4, E5, E8, E9, E10, E11 ve E12 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozu Dex-cAMP ile indüklenen PEPCK gen ekspresyonunu sırasıyla, % 27, % 11, % 59, % 88, % 86, % 91 ve % 83 oranlarında baskılamıştır. E5 fraksiyonu haricindeki tüm baskılama oranları istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). E1, E2, E3, E6 ve E7 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozu PEPCK ekspresyonunu, (+) Dex-cAMP kontrole kıyasla sırasıyla %11, % 90, % 61, % 16 ve % 36 oranlarında artırmıştır (Şekil 4.25). Şekil 4.25'de belirtilen, (+) Dex-cAMP,

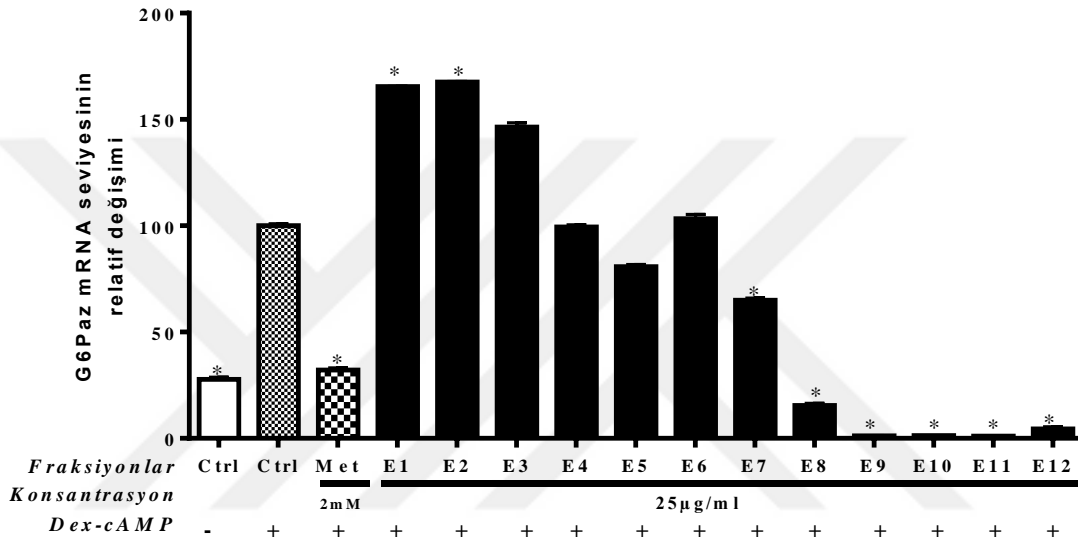
glukoneojenezin indüklendiği besiyerini, (-) Dex-cAMP yalnızca DMEM besiyerini ifade etmektedir. E1-E12 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozda uygulamaları (+) Dex-cAMP içerisinde yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan metforminin dozu 2 mM'dır. PEPCK gen ekspresyon seviyesi β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (+) Dex-cAMP kontrol değeri % 100 olarak alınmıştır. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır.



Şekil 4.25. E1-E12 fraksiyonlarının H4IIE hücrelerinde PEPCK gen ekspresyon seviyesine etkileri. *(+) Dex-cAMP indüklenmiş kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

E1-E12 fraksiyonlarının G6Paz gen ekspresyon seviyesine olan etkisi Şekil 4.26' da verilmektedir. Buna göre, Dex-cAMP uygulamasının G6Paz gen ekspresyonunu (-) Dex-cAMP kontrole kıyasla % 72 oranında artırarak glukoneojenezi indüklediği görülmüştür. Pozitif kontrol olarak kullanılan metformin (2mM dozda) glukoneojenezin indüklendiği hücrelerde G6Paz ekspresyonunu % 68 oranında azaltarak indüklemeye yapılmamış kontrol hücrelerindeki seviyelere çekmiştir. Elde edilen verilere göre, E5, E7, E8, E9, E10, E11 ve E12 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozu Dex-cAMP ile indüklenen G6Paz gen ekspresyonunu sırasıyla, %19, % 35, % 99, % 99, % 99 ve % 96 oranlarında baskılamıştır. E5 fraksiyonu haricindeki tüm baskılama oranları istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). E4 fraksiyonu ise, herhangi bir değişiklik yaratmamıştır. Ayrıca, diğer fraksiyonlardan E1, E2, E3 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozu G6Paz ekspresyonunu, (+) Dex-cAMP kontrol grubuna

kıyasla sırasıyla % 65, % 68, % 46 oranlarında artırırken, E6 fraksiyonu herhangi bir değişiklik yaratmamıştır. Şekil 4.26’da belirtilen, (+) Dex-cAMP glukoneojenezin indüklendiği besiyerini, (-) Dex-cAMP yalnızca DMEM besiyerini ifade etmektedir. E1-E12 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozda uygulamaları (+) Dex-cAMP içerisinde yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan metforminin dozu 2 mM’dır. G6Paz gen ekspresyon seviyesi β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (+) Dex-cAMP değeri % 100 olarak alınmıştır. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır.

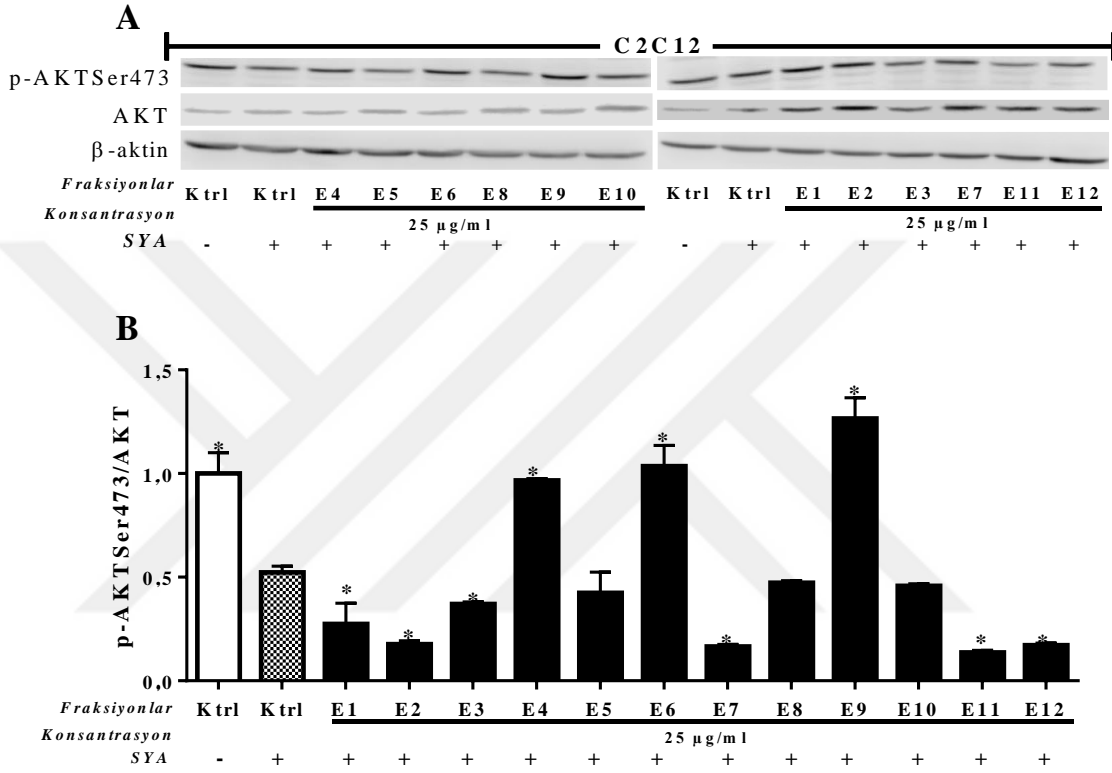


Şekil 4.26. E1-E12 fraksiyonlarının H4IIE hücrelerinde G6Paz gen ekspresyon seviyesine etkileri. * (+) Dex-cAMP indüklenmiş kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

4.1.2.3. Fraksiyonlarının İnsülin Direnci Geliştirilen C2C12 Hücrelerinde Hedef Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkileri

İnsülin direnci geliştirilen C2C12 hücrelerinde, E1-E12 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozunda yapılan uygulamalarının p-AKTSer473/AKT oranı üzerine etkileri Şekil 4.27’de verilmiştir. Tarama sonuçlarına göre, insülin direnci gelişimiyle % 48 oranında azalan p-AKT seviyesini E4, E6, E9 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozları % 40, % 48, % 69 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırırken, E1, E2, E3, E5, E7, E8 ve E10, E11 ve E12 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozları sırasıyla, % 21, % 31, % 12, % 32, % 14, % 9, % 10, % 35, % 32 oranlarında daha da azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.27). Şekil 4.27’de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ

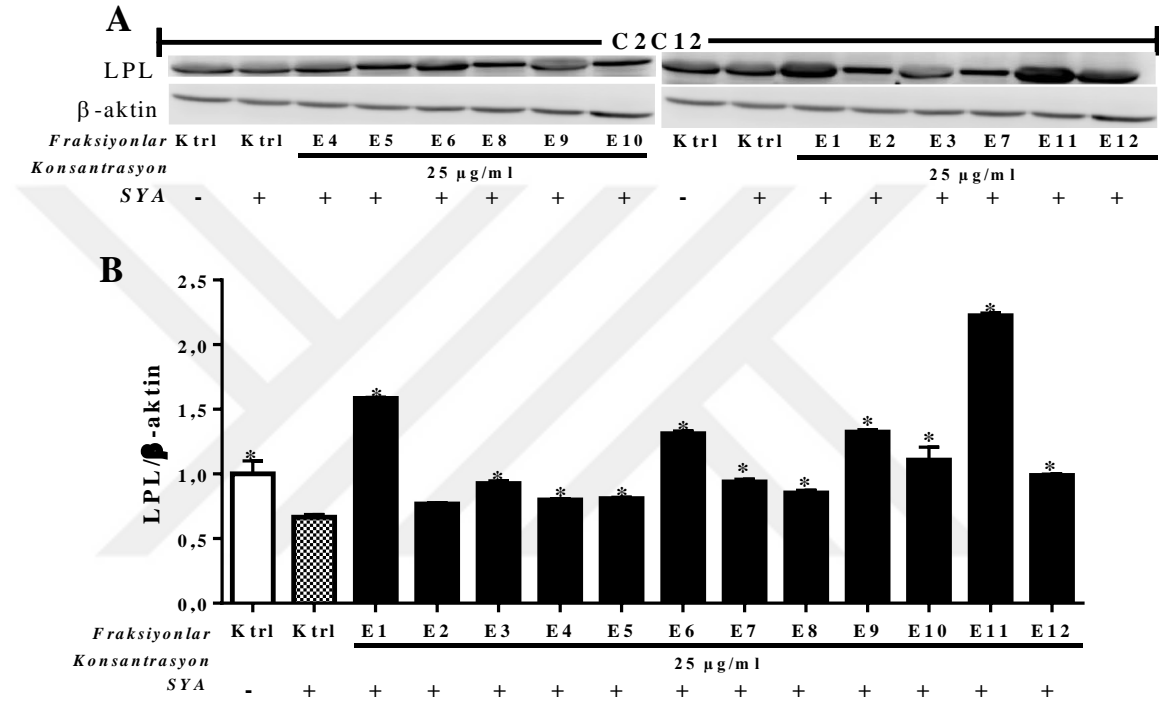
asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-E1-E12-25 µg/mL şeklindedir. p-AKTSer473 ve AKT protein seviyeleri β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.27. E1-E12 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki p-AKTSer473/AKT proteinlerinin seviyesi üzerine etkileri, (B) p-AKTSer473/AKT proteinlerinin seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması.* (+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

İnsülin direnci geliştirilen C2C12 hücrelerinde, EE alt fraksiyonlarının 25 µg/mL dozunda yapılan uygulamaların LPL seviyeleri üzerine etkileri Şekil 4.28'de verilmiştir. Tarama sonuçlarına göre, insülin direnci gelişimiyle % 34 oranında azalan LPL seviyesini E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10 E11 ve E12 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozlarının % 94, % 12, % 28 % 11, % 12, % 62, % 30, % 16, % 63, % 41, % 158 ve % 34 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığı görülmüştür (p<0.05), (Şekil 4.28). Şekil

4.28’de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-E1-12-25 µg/mL şeklindedir. LPL protein seviyeleri β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.28. E1-E12 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki LPL protein seviyesi üzerine etkileri. (B) LPL protein seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

Yukarıda tek tek verilen sonuçlarla fraksiyonların (E1-E12) insülin direnci ve dislipidemiye karşı etkinlikleri 5 ayrı parametre kullanılarak, kontrollü ve tekrarlı deneylerle taranmıştır. Tarama sonuçlarından elde edilen verilerin 5 ayrı parametredeki % değişimleri genel sonuç tablosunda verilmiştir (Çizelge 4.2). İncelenen parametrelerde istenilen yönde (artış/azalış) % 50 ve üzerinde değişime neden olan fraksiyonlar işaretlenmiştir.

Çizelge 4.2. EE'den elde edilen (E1-E12) fraksiyonların 5 ayrı parametre ile taranması sonucunda ortaya çıkan % değişim tablosu

BIYOMARKERLAR (% Değişim)					
EA ALT FRAKSİYONLARI (25 µg/ml)	Glukonojenik	PEPCK	G6Paz	p-AKT/AKT	LPL
	Glukoz Üretimi Beklenen: %50' nin üzerinde azalış	Ekspresyonu Beklenen: %50' nin üzerinde baskılama	Ekspresyonu Beklenen: %50' nin üzerinde baskılama	Protein Seviyesi Beklenen: %50' nin üzerinde artış	Protein Seviyesi Beklenen: %50' nin üzerinde artış
E1	39 ↓	11 ↑	65 ↑	21 ↓	94 ↑
E2	20 ↑	90 ↑	68 ↑	31 ↓	12 ↑
E3	36 ↓	61 ↑	46 ↑	12 ↓	28 ↑
E4	61 ↓	27 ↓	1 ↓	40 ↑	11 ↑
E5	69 ↓	11 ↓	19 ↓	14 ↓	12 ↑
E6	47 ↓	16 ↑	3 ↑	48 ↑	62 ↑
E7	47 ↓	36 ↑	35 ↓	32 ↓	30 ↑
E8	62 ↓	59 ↓	85 ↓	9 ↓	16 ↑
E9	64 ↓	88 ↓	99 ↓	69 ↑	63 ↑
E10	63 ↓	86 ↓	99 ↓	10 ↓	41 ↑
E11	48 ↓	91 ↓	99 ↓	35 ↓	158 ↑
E12	40 ↓	83 ↓	96 ↓	32 ↓	34 ↑

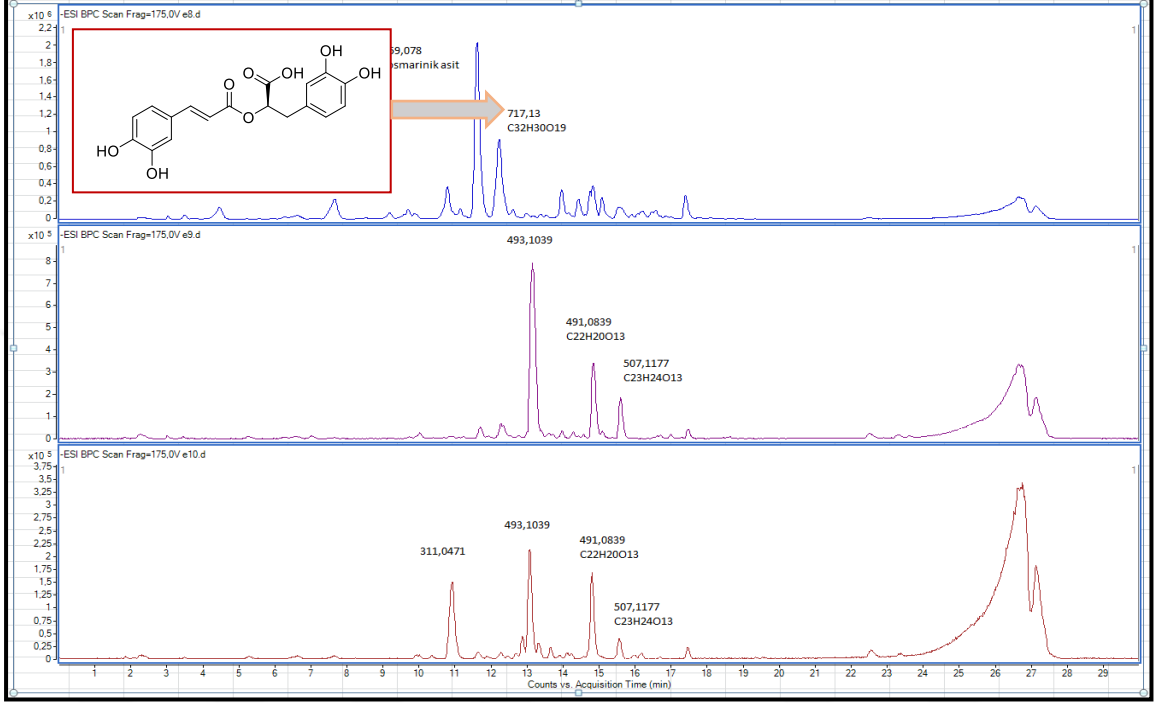
Çizelge 4.2'ye göre, etkin fraksiyon seçiminde en az 3 parametrede % 50 ve üzerinde beklenen değişimi gösteren fraksiyonlar “aktif fraksiyon” olarak seçilmiştir. Sonuçlara göre E8, E10 ve E11 en az üç parametrede hedeflenen etkiyi gösterirken, **E9 fraksiyonu** tüm parametrelerde hedeflenen etkiyi yüksek oranlarda sağlayarak **en etkin fraksiyon** olarak belirlenmiştir. Bu fraksiyonlar kullanılarak biyoaktivite rehberli etken madde aydınlatma ve saflaştırma çalışmalarına devam edilmiştir.

4.1.3. Aktif Olarak Belirlenen Fraksiyonlardan Etkin Moleküllerin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoaktivite Çalışmaları

En etkin moleküllerin belirlenmesi amacıyla, aktif olarak seçilen fraksiyonlardan (E8, E9, E10, E11) saflaştırılan bileşiklerle H4IIE hücrelerinde glukoneojenik glukoz üretiminin ölçümü ile PEPCK ve G6Paz enzimlerinin gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler kullanılarak genel bir tarama testi yapılmıştır. Bu testin sonucuna göre seçilen parametrelerden hiçbirinde etkinlik göstermeyen maddeler ileri mekanizma çalışmalarına dahil edilmemiştir.

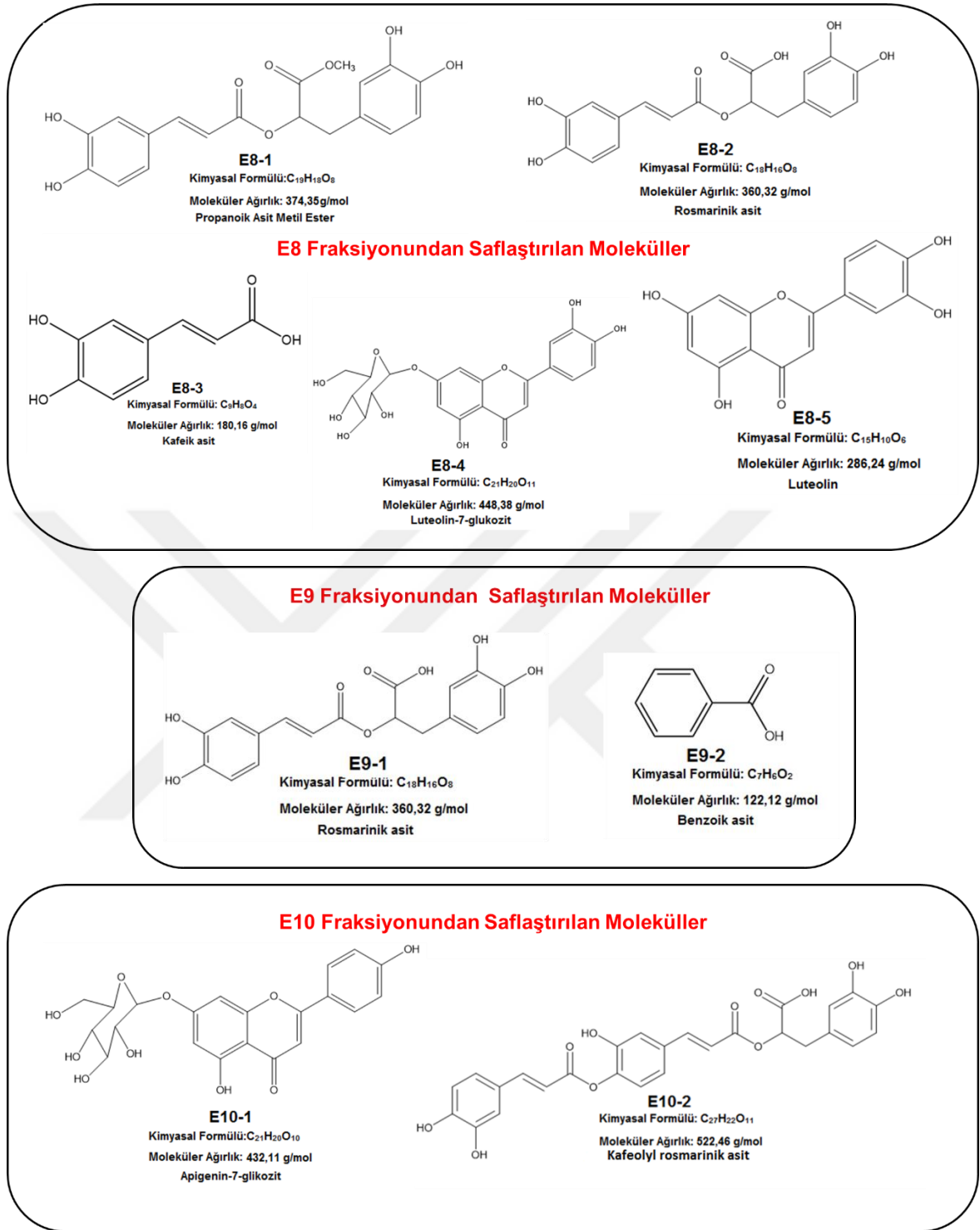
4.1.3.1. Etkin moleküllerin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Aktif fraksiyonların (E8, E9 ve E10) HPLC-TOF/MS analizi sonucunda elde edilen HPLC-TOF kromatogramları ve negatif iyon kütleleri Şekil 4.29’ da verilmiştir. Rosmarinik asit standart olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.29. Aktif fraksiyonların (E8, E9 ve E10) HPLC-TOF kromatogramları ve negatif iyon kütleleri

Saflaştırılan moleküllerin yapıları, yüksek çözünürlükteki 600 MHz NMR cihazı ile belirlenmiştir. Saflaştırılan bileşiklerin molekül yapıları Şekil 4.30’da verilmiştir. Saflaştırılan bileşiklerin yapısındaki karbon ve protonların varlığı, moleküldeki konumları ve uzaysal olarak yönelmesi 1D ve 2D NMR teknikleri ile belirlenmiştir. Yapısı belirlenen saf maddelere ait NMR spektrumları EK 2.1, EK 2.2 ve EK 2.3’de verilmiştir. E8 fraksiyonundan flash kromatografisi ile 5 adet molekülün yapısı aydınlatılmıştır. Bunlar, RA (Rosmarinik asit), CA (Kafeik asit), LUT (Luteolin), PAME (Propanoik asit metil ester), L7G (Luteolin-7-glukozit) olarak belirlenmiştir. E9 fraksiyonundan flash kromatografisi ile 2 adet molekülün yapısı aydınlatılmıştır. Bunlar, RA (Rosmarinik asit) ve BA (Benzoik asit) olarak belirlenmiştir. E10 fraksiyonundan flash kromatografisi ile 2 adet molekülün yapısı aydınlatılmıştır. Bunlar, A7G (Apigenin-7-glukozit), RA-CA (kaffeoyl rosmarinik asit) olarak belirlenmiştir.

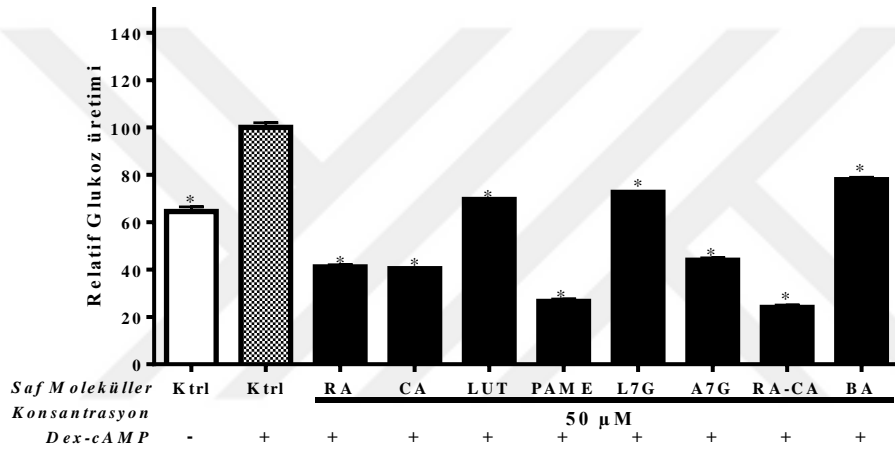


Şekil 4.30. E8, E9, ve E10 fraksiyonundan izole edilen bileşiklerin yapıları

4.1.3.2. Saflaştırılan Bileşiklerin H4IIE Hepatoma Hücrelerinde Glukoneojenik Glukoz Üretimi Üzerine Etkileri

Saflaştırılan bileşiklerin 50 µM dozlarının H4IIE hücrelerinde glukoneojenik glukoz üretimi üzerine etkileri Şekil 4.31' de verilmiştir. Buna göre, glukoneojenezin indüklenmesiyle % 35 oranında artan glukoneojenik glukoz üretimi; RA, CA, LUT,

PAME, L7G, A7G, RA-CA, BA bileşiklerinin 50 µM dozlarının uygulaması sonrası sırasıyla % 59, % 60, % 30, % 73, % 27, % 56, % 76, % 22 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı ve oldukça etkili bir şekilde baskılanmıştır ($p < 0,05$, Şekil 4.31). Şekil 4.31’de belirtilen, (+) Dex-cAMP glukoneojenezin indüklendiği besiyerini, (-) Dex-cAMP yalnızca DMEM besiyerini ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) Dex-cAMP, (+) Dex-cAMP, Dex-cAMP içeren besiyeri içinde uygulanan RA-50 µM, CA-50 µM, LUT-50 µM, PAME-50 µM, L7G-50 µM, A7G-50 µM, RA-CA-50 µM, BA-50 µM şeklindedir. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır. Normalizasyon sonrası (+) Dex-cAMP değeri % 100 olarak alınmıştır.

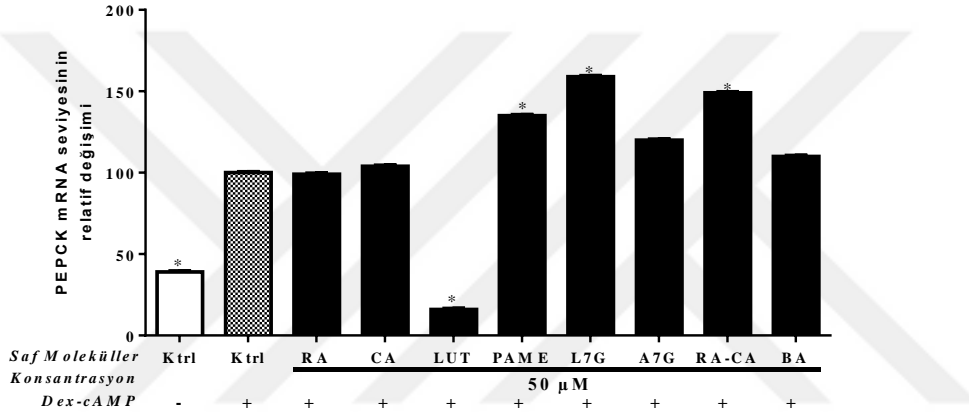


Şekil 4.31. Saflaştırılan bileşiklerin 50 µM dozlarının H4IIE hücrelerinde glukoneojenik glukoz üretimi üzerine etkileri. * (+) Dex-c-AMP kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

4.1.3.3. Saflaştırılan Bileşiklerin H4IIE Hepatoma Hücrelerinde PEPCK ve G6Paz enzimlerinin mRNA seviyesi Üzerine Etkileri

Glukoneojenik glukoz üretimi deneyi sonrasında, saflaştırılan bileşiklerin 50 µM dozunun PEPCK ve G6Paz gen ekspresyon seviyesine olan etkileri değerlendirilmiştir. Deney sonuçlarına göre, Dex-cAMP uygulaması, PEPCK ekspresyonunu (-) Dex-cAMP kontrolüne kıyasla % 61 oranında anlamlı şekilde artırarak bu hücrelerde glukoneojenezi başarılı bir şekilde indüklemiştir. Elde edilen verilere göre, 50 µM dozdaki RA, CA, A7G, BA bileşikleri, Dex-cAMP ile indüklenen PEPCK gen ekspresyonunda anlamlı değişiklikler yaratmazken, LUT bileşiği PEPCK gen ekspresyonunu % 84 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılamıştır ($p < 0,05$). PAME, L7G, RA-CA

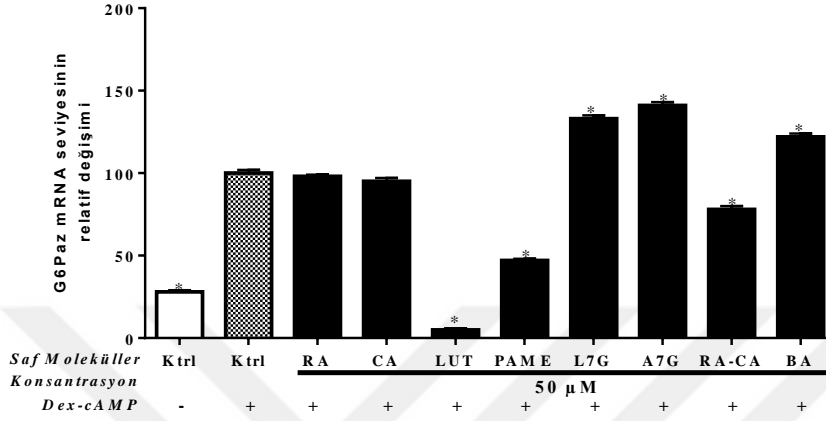
bileşiklerinin 50 µM dozlarının ise, PEPCK gen ekspresyonlarında % 35, % 59, % 49 oranından artışlara neden olduğu görülmüştür ($p < 0,05$), (Şekil 4.32). Şekil 4.32’de belirtilen, (-) Dex-cAMP: yalnızca DMEM besiyerini, (+) Dex-cAMP glukoneojenezin indüklendiği besiyerini ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) Dex-cAMP, (+) Dex-cAMP, Dex-cAMP içeren besiyeri içinde uygulanan RA-50 µM, CA-50 µM, LUT-50 µM, PAME-50 µM, L7G-50 µM, A7G-50 µM, RA-CA-50 µM, BA-50 µM şeklindedir. PEPCK gen ekspresyon seviyesi β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (+) Dex-cAMP değeri % 100 olarak alınmıştır. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır.



Şekil 4.32. Saflaştırılan bileşiklerin 50 µM dozlarının H4IIE hücrelerinde PEPCK gen ekspresyon seviyesine etkileri. *(+) Dex-cAMP indüklenmiş kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

Saflaştırılan bileşiklerin 50 µM dozunun G6Paz gen ekspresyon seviyesine olan etkisi Şekil 4.33’de verilmektedir. Buna göre, Dex-cAMP uygulaması, (+) Dex-cAMP kontrol hücrelerinde ekspresyon seviyesini (-) Dex-cAMP kontrole kıyasla % 72 oranında artırarak glukoneojenezi indüklemiştir. Elde edilen verilere göre, RA ve CA bileşiklerinin Dex-cAMP ile indüklenen G6Paz gen ekspresyonunda değişiklik yaratmadığı görülürken, LUT, PAME, RA-CA bileşiklerinin sırasıyla, % 95, % 53, % 22 oranlarında anlamlı derecede baskıladığı görülmüştür ($p < 0,05$). L7G, A7G, BA bileşiklerinin 50 µM dozlarının ise, G6Paz gen ekspresyonunda % 33, % 41, % 22 oranlarında artışlara neden olduğu görülmüştür ($p < 0,05$), (Şekil 4.33). Şekil 4.33’de belirtilen, (-) Dex-cAMP yalnızca DMEM besiyerini, (+) Dex-cAMP glukoneojenezin indüklendiği besiyerini ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) Dex-cAMP, (+) Dex-cAMP, Dex-cAMP içeren besiyeri

içinde uygulanan RA-50 μ M, CA-50 μ M, LUT-50 μ M, PAME-50 μ M, L7G-50 μ M, A7G-50 μ M, RA-CA-50 μ M, BA-50 μ M şeklindedir. G6Paz gen ekspresyon seviyesi β -aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (+) Dex-cAMP değeri değeri % 100 olarak alınmıştır. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır.



Şekil 4.33. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μ M dozlarının H4IIE hücrelerinde G6Paz gen ekspresyon seviyesine etkileri. *(+) Dex-cAMP indüklenmiş kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

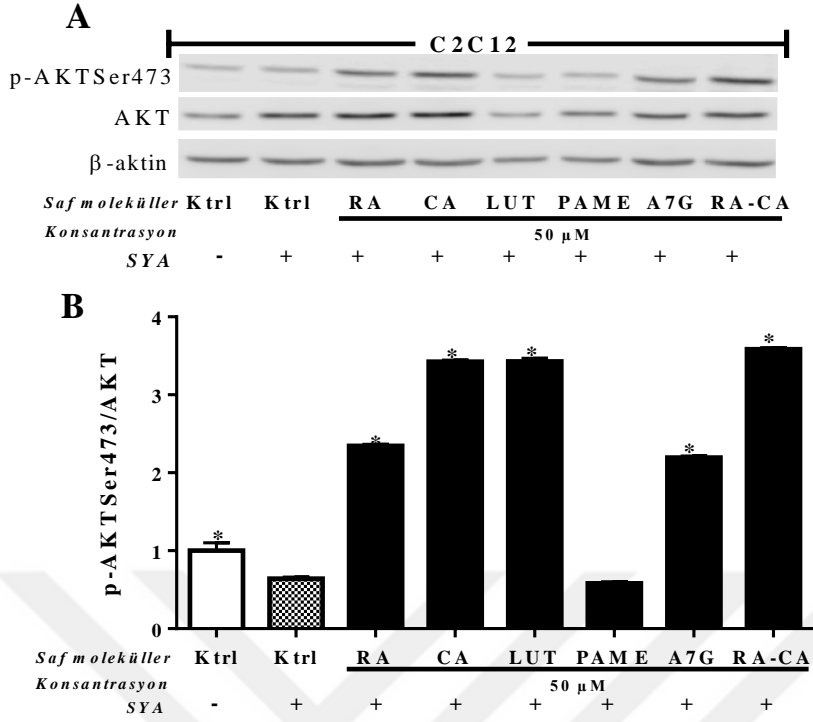
Saflaştırılan bileşiklerle yapılan tarama testi sonuçlarına göre, L7G ve BA bileşikleri bahsedilen parametreler üzerinde etkinlik göstermediklerinden ileri mekanizma çalışmalarına dahil edilmemiştir. Bu çalışmalara, RA, CA, LUT, PAME, A7G, RA-CA bileşikleri ile devam edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Saflaştırılan bileşiklerin tarama sonuçları

BİYOMARKERLAR (% Değişim)			
Saflaştırılan Bileşikler (50 µM)	Glukonojenik Glukoz Üretimi	PEPCK ekspresyonu	G6Paz Ekspresyonu
RA	59 ↓	1 ↓	2 ↓
CA	60 ↓	4 ↑	5 ↓
LUT	30 ↓	84 ↓	95 ↓
PAME	73 ↓	35 ↑	53 ↓
L7G	27 ↓	59 ↑	33 ↑
A7G	56 ↓	20 ↑	41 ↑
RA-CA	76 ↓	49 ↑	22 ↓
BA	22 ↓	10 ↑	22 ↑

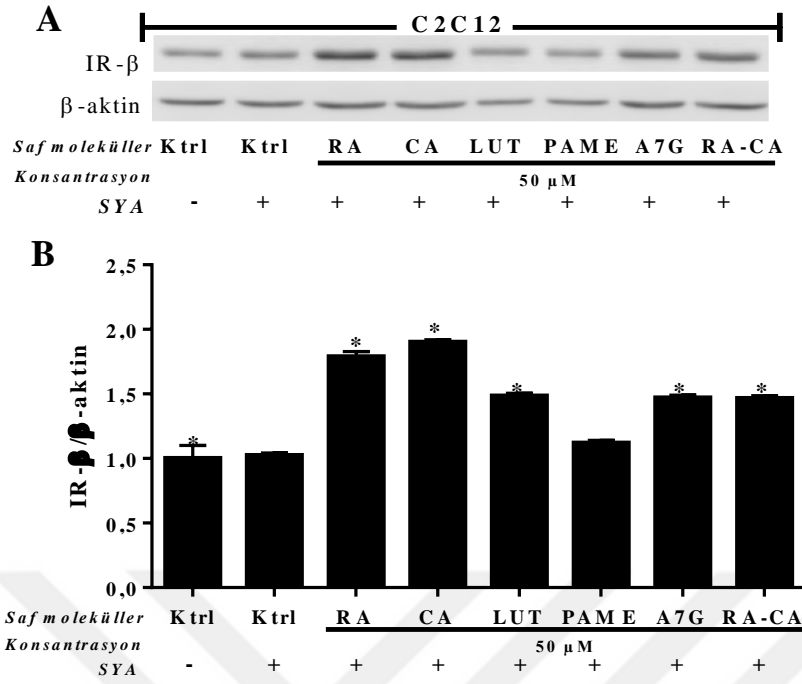
4.1.3.4. Saflaştırılan Bileşiklerin İnsülin Direnci Geliştirilen C2C12 Hücrelerinde Hedef Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkileri

İnsülin direnci geliştirilen C2C12 hücrelerinde, saf bileşiklerin 50 µM dozda yapılan uygulamalarının p-AKTSer473/AKT seviyeleri üzerine etkileri Şekil 4.34’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, insülin direnci gelişimiyle % 36 oranında azalan p-AKTSer473/AKT oranını; RA, CA, LUT, A7G, RA-CA bileşiklerinin 50 µM dozu, sırasıyla % 170, % 278, % 279, % 155, % 294 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırırken ($p < 0,05$), PAME bileşiği (+) SYA grubuna kıyasla anlamlı herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.34). Şekil 4.34’de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-RA-50 µM, (+) SYA-CA-50 µM, (+) SYA-LUT-50 µM, (+) SYA-PAME-50 µM, (+) SYA-A7G-50 µM, (+) SYA-RA-CA-50 µM şeklindedir. p-AKTSer473 ve AKT protein seviyeleri β-aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



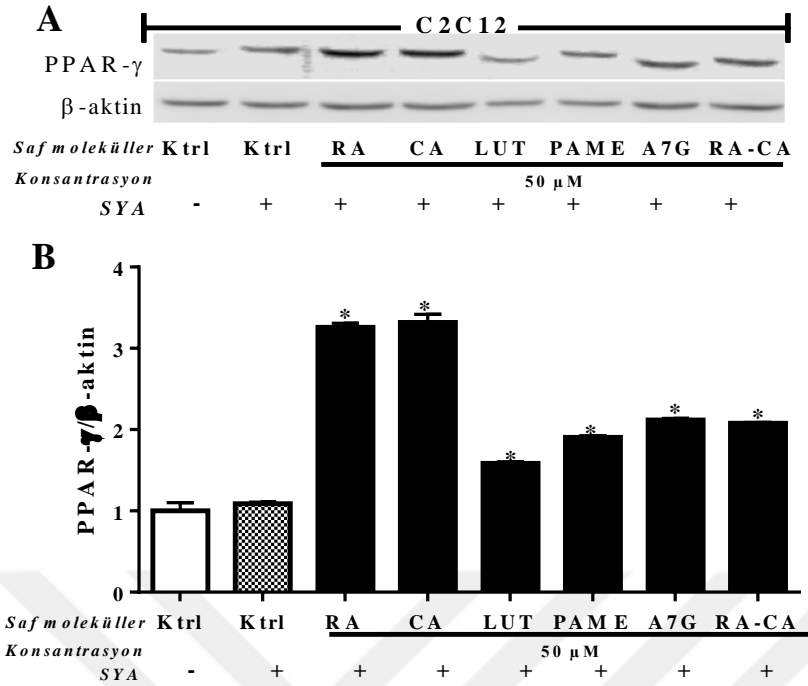
Şekil 4.34. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μ M dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki p-AKTSer473/AKT proteinlerinin seviyesi üzerine etkileri. (B) p-AKTSer473/AKT proteinlerinin seviyelerinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

İnsülin direnci geliştirilen C2C12 hücrelerinde, saf bileşiklerin 50 μ M dozda yapılan uygulamalarının IR- β seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.35’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, RA, CA, LUT, A7G, RA-CA bileşikleri 50 μ M dozda IR- β seviyesini (+) SYA kontrol grubuna kıyasla sırasıyla % 76, % 88, % 46, % 45, % 44 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırırken ($p < 0,05$), PAME bileşiği herhangi bir değişiklik yaratmamıştır. (Şekil 4.35). Şekil 4.35’de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-RA-50 μ M, (+) SYA-CA-50 μ M, (+) SYA-LUT-50 μ M, (+) SYA-PAME-50 μ M, (+) SYA-A7G-50 μ M, (+) SYA-RA-CA-50 μ M şeklindedir. IR- β protein seviyesi β -aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.35. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μ M dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki IR- β protein seviyesi üzerine etkileri. (B) IR- β protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. * (+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

Saf bileşiklerin C2C12 hücrelerinde araştırılan bir diğer hedef protein PPAR- γ 'nın seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.36'da verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, RA, CA, LUT, PAME, A7G, RA-CA bileşiklerinin 50 μ M dozunun PPAR- γ protein seviyesini (+) SYA kontrol grubuna kıyasla sırasıyla % 217, % 223, % 49, % 81, % 103, % 99 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığı görülmüştür ($p < 0,05$). Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir. (Şekil 4.36). Şekil 4.36'da belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-RA-50 μ M, (+) SYA-CA-50 μ M, (+) SYA-LUT-50 μ M, (+) SYA-PAME-50 μ M, (+) SYA-A7G-50 μ M, (+) SYA-RA-CA-50 μ M şeklindedir. PPAR- γ protein seviyesi β -aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır.

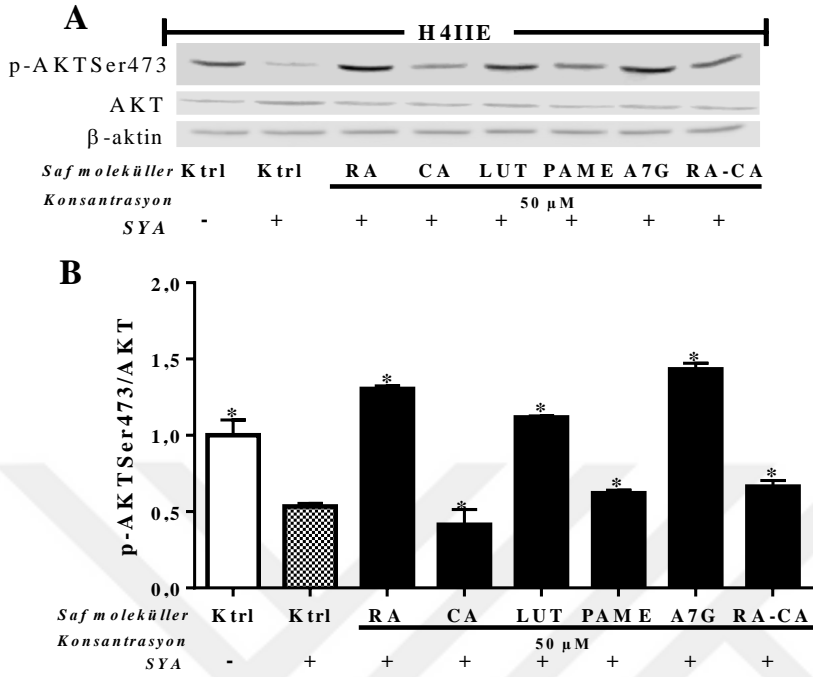


Şekil 4.36. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μ M dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan C2C12 fare iskelet kası hücrelerindeki PPAR- γ protein seviyesi üzerine etkileri. (B) PPAR- γ protein seviyesinin densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. * (+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

4.1.3.5. Saflaştırılan Bileşiklerin İnsülin Direnci Geliştirilen H4IIE Hücrelerinde Hedef Proteinlerin Seviyeleri Üzerine Etkileri

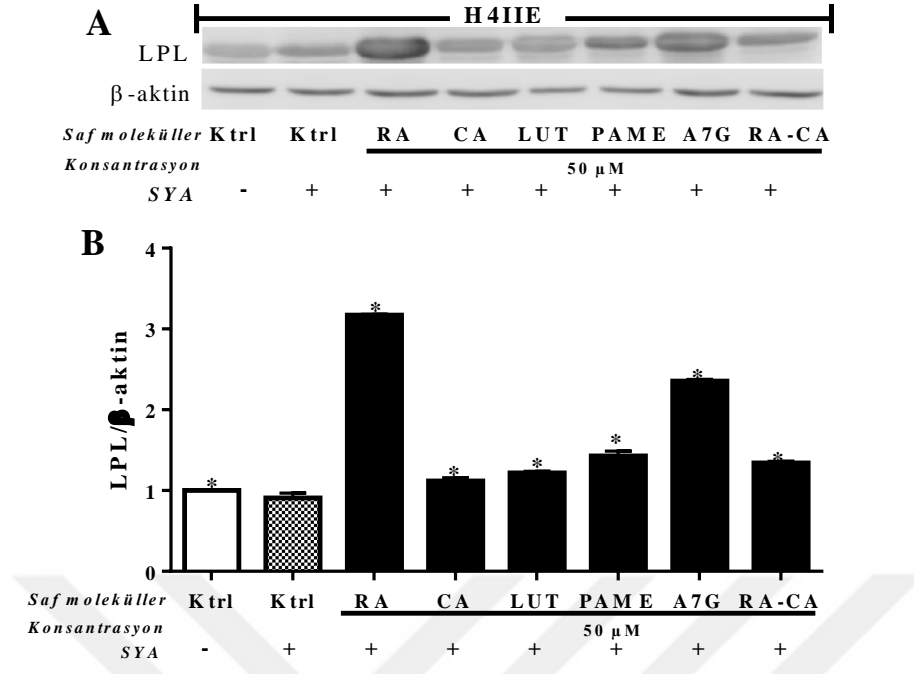
İnsülin direnci geliştirilen H4IIE hücrelerinde, saf bileşiklerin 50 μ M dozda yapılan uygulamalarının p-AKTSer473/AKT seviyeleri üzerine etkileri Şekil 4.37’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, insülin direnci gelişimiyle % 47 oranında azalan p-AKT seviyesini RA, LUT, PAME, A7G, RA-CA bileşiklerinin 50 μ M dozu sırasıyla % 79, % 58, % 10, % 90, % 13 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırırken ($p < 0,05$), CA bileşiği % 12 oranında azaltmıştır. (Şekil 4.37). Şekil 4.37’de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-RA-50 μ M, (+) SYA-CA-50 μ M, (+) SYA-LUT-50 μ M, (+) SYA-PAME-50 μ M, (+) SYA-A7G-50 μ M, (+) SYA-RA-CA-50 μ M şeklindedir. p-AKTSer473/AKT protein seviyesi β -aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software

kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.37. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μ M dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hücrelerindeki p-AKTser473/AKT proteinlerinin seviyesi üzerine etkileri. (B) p-AKTser473/AKT oranının densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. * (+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

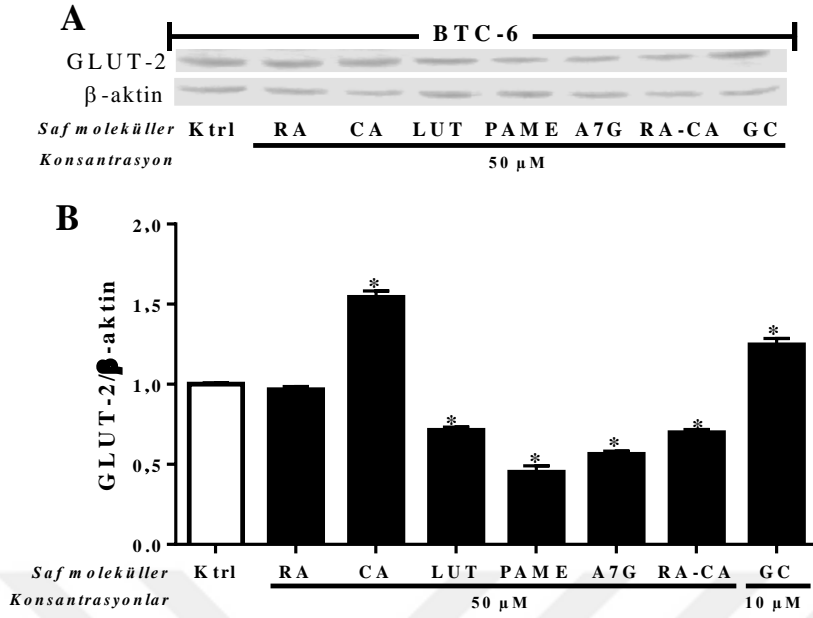
İnsülin direnci geliştirilen H4IIE hücrelerinde, saf bileşiklerin 50 μ M dozda yapılan uygulamalarının LPL seviyeleri üzerine etkileri Şekil 4.38' de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, insülin direnci gelişimiyle % 10 oranında azalan LPL seviyesini RA, CA, LUT, PAME, A7G, RA-CA bileşiklerinin 50 μ M dozu sırasıyla % 327, % 21, % 31, % 52, % 245, % 44 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır ($p < 0,05$, Şekil 4.38). Şekil 4.38'de belirtilen, (-) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılmayan, (+) SYA, serbest yağ asidi uygulaması yapılarak insülin direnci oluşturulan hücreleri ifade etmektedir. Uygulama grupları, (-) SYA kontrol, (+) SYA kontrol, (+) SYA-RA-50 μ M, (+) SYA-CA-50 μ M, (+) SYA-LUT-50 μ M, (+) SYA-PAME-50 μ M, (+) SYA-A7G-50 μ M, (+) SYA-RA-CA-50 μ M şeklindedir. LPL protein seviyesi β -aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası (-) SYA kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.38. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μ M dozlarının (A) serbest yağ asidi ile insülin direnci oluşturulan H4IIE hücrelerindeki LPL protein seviyesi üzerine etkileri. (B) LPL protein seviyesi densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *(+) SYA kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

4.1.3.6. Saflaştırılan Bileşiklerin Pankreatik BTC-6 Hücrelerinde GLUT2 Protein Seviyesi Üzerine Etkileri

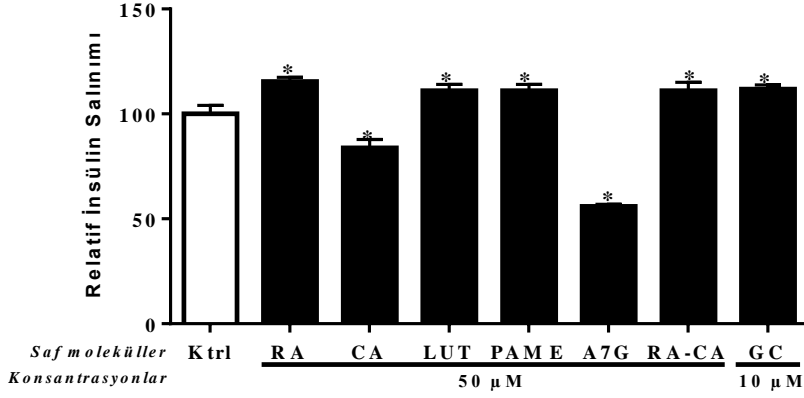
BTC-6 hücrelerinde saf bileşiklerin 50 μ M dozda yapılan uygulamalarının GLUT2 protein seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.39’da verilmiştir. Elde edilen verilere göre, CA bileşiğinin 50 μ M dozu kontrol grubuna kıyasla GLUT-2 protein seviyesini % 54 oranında artmıştır ($p < 0,05$). GLUT-2 protein seviyesinde RA bileşiği anlamlı bir değişiklik yaratmazken, LUT, PAME, A7G, RA-CA bileşikleri GLUT2 seviyesini kontrol grubuna kıyasla sırasıyla % 29, % 55, % 44, % 30 oranlarında azaltmıştır ($p < 0,05$). Pozitif kontrol olarak kullanılan glibenklamidin ise, % 25 oranında artışa neden olduğu görülmüştür. (Şekil 4.39). Şekil 4.39’da belirtilen uygulama grupları, kontrol, RA-50 μ M, CA-50 μ M, LUT-50 μ M, PAME-50 μ M, A7G-50 μ M, RA-CA-50 μ M, GC: Glibenklamid 10 μ M şeklindedir. GLUT-2 protein seviyesi β -aktine göre normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrası kontrol değeri 1 olarak alınmıştır. Bantlar Studio Image software kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.39. Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının (A) BTC-6 pankreatik beta hücrelerinde hücrelerindeki GLUT-2 protein seviyesi üzerine etkileri. (b) GLUT-2 protein seviyesi densitometrik analizlerinin karşılaştırılması. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p < 0,05$)

4.1.3.7. Saflaştırılan Bileşiklerin Pankreatik BTC-6 Hücrelerinde İnsülin Salınımı Üzerine Etkileri

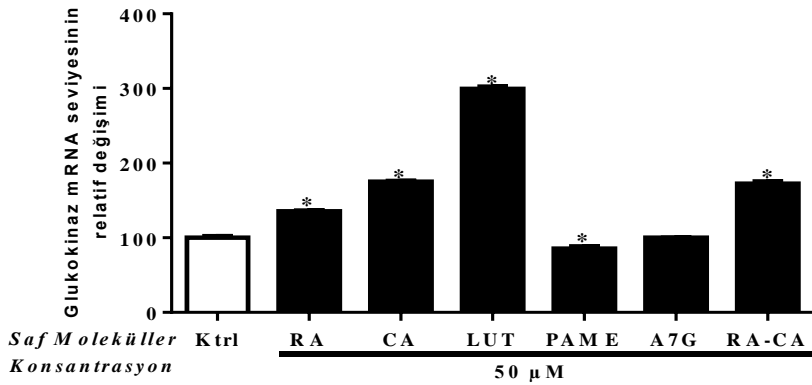
Saflaştırılan bileşiklerin 50 μM dozlarının BTC-6 hücrelerinde insülin salınımı üzerine etkileri Şekil 4.40'da verilmiştir. Buna göre, RA, LUT, PAME ve RA-CA bileşiklerinin 50 μM dozu insülin salınımını kontrole kıyasla % 15 % 11, % 10, % 11 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırırken ($p < 0,05$), CA ve A7G bileşiklerinin % 16 ve % 44 oranlarında baskıladığı görülmüştür (Şekil 4.40). İnsülin salınımını artıran bileşikler pozitif kontrol olarak kullanılan Glibenklamid'e yakın değerlerde bir etki yaratmıştır. Şekil 4.40'da belirtilen uygulama grupları, kontrol, RA-50 μM, CA-50 μM, LUT-50 μM, PAME-50 μM, A7G-50 μM, RA-CA-50 μM, GC-10 μM şeklindedir. Normalizasyon sonrası kontrol değeri % 100 olarak alınmıştır.



Şekil 4.40. Saflaştırılan bileşiklerin 50 µM dozlarının BTC-6 pankreatik beta hücrelerinde insülin salınımı üzerine etkileri. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

4.1.3.8. Saflaştırılan Bileşiklerin Pankreatik BTC-6 Hücrelerinde Glukokinaz mRNA Seviyesi Üzerine Etkileri

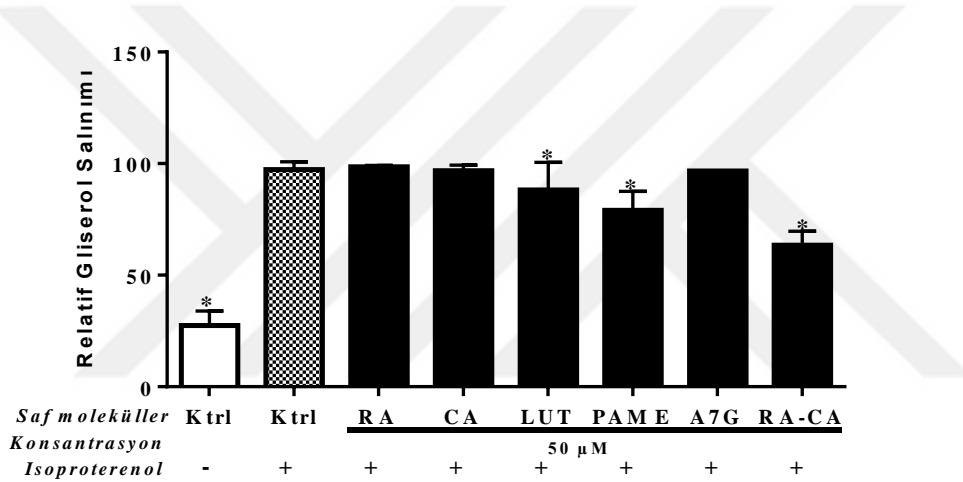
Saflaştırılan bileşiklerin 50 µM dozlarının BTC-6 hücrelerinde Glukokinaz mRNA seviyesi üzerine etkileri Şekil 4.41’ de verilmiştir. Buna göre, RA, CA, LUT, RA-CA bileşiklerinin 50 µM dozu Glukokinaz mRNA seviyesini kontrole kıyasla sırasıyla, % 36 % 75, % 199, % 72 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırırken (p<0.05), PAME bileşiğinin % 15 oranında baskıladığı görülmüştür (Şekil 4.41). A7G bileşiği anlamlı bir değişim yaratmamıştır. Şekil 4.41’de belirtilen uygulama grupları, kontrol, RA-50 µM, CA-50 µM, LUT-50 µM, PAME-50 µM, A7G-50 µM, RA-CA-50 µM, GC-10 µM şeklindedir. Normalizasyon sonrası kontrol değeri % 100 olarak alınmıştır.



Şekil 4.41. Saflaştırılan bileşiklerin 50 µM dozlarının BTC-6 pankreatik beta hücrelerinde Glukokinaz mRNA seviyesi üzerine etkileri. *Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

4.1.3.9. Safılaştırılan Bileşiklerin 3T3L1 Hücrelerinde Gliserol Salınımı Üzerine Etkileri

Safılaştırılan bileşiklerin 50 µM dozlarının 3T3L1 hücrelerinde gliserol salınımı üzerine etkileri Şekil 4.42' de verilmiştir. Buna göre, 100 nM dozda isoproterenol uygulamasıyla % 73 oranında indüklenen gliserol salınımını; LUT, PAME ve RA-CA bileşiklerinin 50 µM dozu sırasıyla % 12, % 21, % 37 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde baskılanırken (p<0,05), RA, CA, A7G bileşiklerinin anlamlı bir değişiklik yaratmadığı görülmüştür (Şekil 4.42). Şekil 4.42'de belirtilen uygulama grupları, kontrol, indüklenmiş kontrol (100nM isoproterenol), RA-50 µM, CA-50 µM, LUT-50 µM, PAME-50 µM, A7G-50 µM, RA-CA-50 µM şeklindedir. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır. İsoptererenol (+) kontrol değeri % 100 olarak alınmıştır.



Şekil 4.42. Safılaştırılan bileşiklerin 50 µM dozlarının 3T3L1 hücrelerinde gliserol salınımı üzerine etkileri. * İsoptererenol (+) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

4.1.3.10. Safılaştırılan Bileşiklerin H4IIE Hücrelerinde Transkriptom Üzerine Etkileri

Deney protokollerin uygulamaları sonucu, H4IIE sıçan karaciğer hücrelerinde tüm transkriptom değişimlerini tayin etmek ve uygulamalar arası değişkenlikleri daha geniş bir biçimde ortaya koymak için tüm genom transkriptom analizleri hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için insülin sinyal yolağında ve glukoz metabolizmasında merkezi düzenleyici rolleri hepatik hücreler seçilmiştir. Bu analizler yedi farklı grupta yapılmıştır: 1. Grup: (+) SYA (insülin direnci geliştirilen), 2.Grup: (-) SYA (normal kontrol), 3. Grup: RA 50 µM (+) SYA, 4.Grup: CA 50 µM (+) SYA, 5. Grup: RA-CA 50

μM (+) SYA, 6. Grup: LUT 50 μM (+) SYA, 7. Grup: EE-25 $\mu\text{g/ml}$ (+) SYA. Bu analiz için öncelikle, H4IIE hücrelerinde serbest yağ asidi uygulaması ile insülin direnci modeli geliştirilerek, aktif ekstrat/bileşiklerin uygulamaları yapılmıştır. Örneklerin RNA izolasyonları, konsantrasyon ve kalite kontrolleri yapılarak, kuru buz içerisinde hizmet alımının gerçekleştirildiği firmaya ulaşması sağlanmıştır. Firma tarafından, örneklerin cRNA dönüşümleri yapılarak Agilent platformunda 55 bin prob kullanılarak, “SurePrint G3 Sıçan Gene Expression 8x60K” ile tüm genom ekspresyon profili çıkarılmıştır.

Ham mikrodizi verisi Agilent Feature Extraction v11.0.1.1 programı yardımı ile elektronik verilere dönüştürülmüştür. Verilerin karşılaştırmalı analizleri için her örneğin verisinden arka plan gürültüsü uzaklaştırılarak ve tüm örneklerin verisi yüzdelik normalizasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra normalize edilen verilere analiz basamaklarında kullanılmak üzere Log transformasyonu uygulanmıştır. Tüm bunlara ek olarak normalize edilen veriler (hangi grupta oldukları göz önüne alınmadan) örneklerin tüm genom gen ekspresyon profillerinin hiyerarşik kümeleme analizleri ‘Correlation-average’ yaklaşımı kullanılarak oluşturulmuştur.

Ön analizin tamamlanmasından sonra elde edilen veriler kullanılarak örnekler gruplandırılmış ve diferansiyel ekspresyon analizi yapılmıştır. Analizler yapılırken gruplar kendi içerisinde değerlendirilmiştir. Her grup içerisinde ise üç test örneği kontrol örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada örnek bazında sadece teknik replikalar alt grupları oluşturduğundan dolayı; problemlerin ekspresyon ölçümlerindeki ‘kat değişim’ (Fold Change) miktarları göz önünde bulundurulmuştur. Çizelge 4.4’de örnekler ve bu örneklerin kontrol örneklerine göre kat değişim limitleri ve bu limitin üzerinde değişim gösteren problemlerin sayısı verilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Örneklerde değişim gösteren prob sayıları

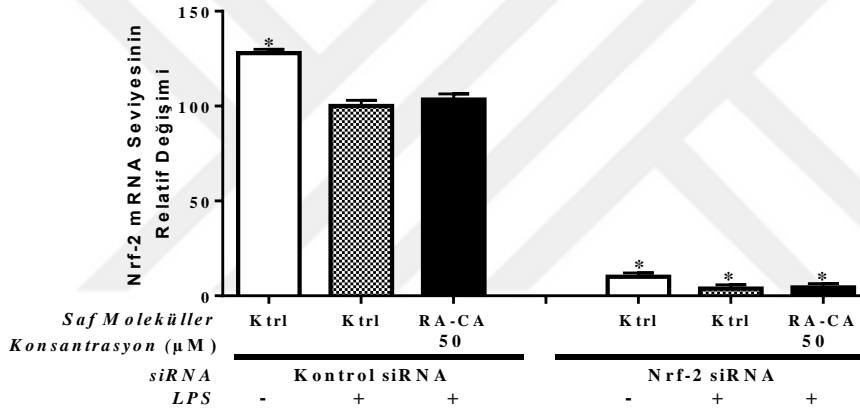
Test örneği	Kontrol örneği	Prob sayısı
SYA (insülin direnci geliştirilen)	SYA (normal kontrol)	3490
RA 50 μM (+)SYA	SYA (insülin direnci geliştirilen)	3045
CA 50 μM (+)SYA	SYA (insülin direnci geliştirilen)	3331
RA-CA 50 μM (+)SYA	SYA (insülin direnci geliştirilen)	3874
LUT 50 μM (+)SYA	SYA (insülin direnci geliştirilen)	3334
EE (25 $\mu\text{g/ml}$) (+)SYA	SYA (insülin direnci geliştirilen)	3818

Mikroarray sinyallerinin filtrelenmesinden sonra, toplam 55.681 prob setinde 28.604 ifade edilmiş transkript bulunmuştur. H4IIE sıçan karaciğer hücrelerinde insülin direnci oluşturulması sonucunda, 1749 adet probun ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla artmış, 1741 adet probun ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla azalmıştır. Bu problemlerin ileri analizleri sonucunda toplam 347 yolda değişimler olduğu saptanmıştır. Gen ekspresyonlarındaki değişimler tek başına yeterli bilgiyi sağlayamadığından, DAVID Biyoinformatik Veritabanı ve KEGG ile yola analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analize göre, insülin direnci ve insülin sekresyonu, PPAR sinyalizasyonu, glukagon sinyalizasyonu ve PI3K-AKT sinyal yolları önemli ölçüde etkilenmiştir. Tüm bu analizler, SYA uygulamasının, insülin direnci (10 gen), insülin sekresyon yolağı (8 gen), PPAR sinyal yolağı (10 gen), immün yanıt (22 gen) ve inflamasyonla (21 gen) ilgili bir grup genin SYA uygulaması yapılmayan kontrol grubuna kıyasla ekspresyonlarının artmasına ve azalmasına neden olduğunu göstermektedir (EK Çizelge 3.1). SYA ile insülin direnci gelişmiş hücrelere EE (25 µg/mL) uygulaması sonucu, insülin direnci oluşturulmayan hücrelere kıyasla 3818 transkriptten 1896 adetinin ekspresyonunun arttığı, 1922 adetinin ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. İnsülin direnci ve insülin sinyal yolağında meydana gelen değişimler yapılan bu analizlerle de saptanmış, mRNA ve protein ifade çalışmalarını destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. Benzer şekilde filtrelenmiş örneklerden FC analizi sonucunda, hücrelere uygulanan RA'nın, 1545 adet probun ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna kıyasla artmasına, 1520 adet probun ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla azalmasına sebep olduğu görülmüştür. Hücre hattında 50 µM CA uygulaması sonucunda 1651 adet probun ekspresyon seviyesi artarken 1680 adet probun ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır. Benzer şekilde, 50 µM RA-CA uygulaması toplamda 3874 adet genin ekspresyonunda (1944 artan ve 1930 azalan) değişime sebep olmuştur. LUT maddesi 1901 adet probun artmasına sebep olurken, 1933 probun azalmasına neden olmuştur. Son olarak EE, 1896 genin ekspresyon seviyesinde artışa neden olurken 1922 genin seviyesinde azalışa neden olmuştur. İleri transkriptom analizleri sonucunda insülin direnci geliştirilen hücrelerle kontrol hücreleri karşılaştırıldığında özellikle karbonhidrat (glukoneojenez, glikojen, glikoliz) ve lipid metabolizmasında (lipojenez ve lipoliz) görev alan yollarda ve bunların sinyal iletiminden sorumlu genlerin ifadelerinde değişimler olduğu ortaya koyulmuştur. Bu değişimler aktif bileşik ve ekstraselüler uygulaması sonucunda önemli oranda kontrol ifadelerine benzer şekilde değişmiştir. Elde edilen sonuçlar, mRNA ve protein ifade çalışmaları ile de paralellik göstermekte olup, bunları doğrulayıcı ve genişletici niteliktedir.

4.1.3.11. İnflamasyon Modeli Geliştirilen RAW264.7 Makrofaj Hücrelerinde RA-CA Molekülünün Nrf-2 Aracılıklı Mekanizması

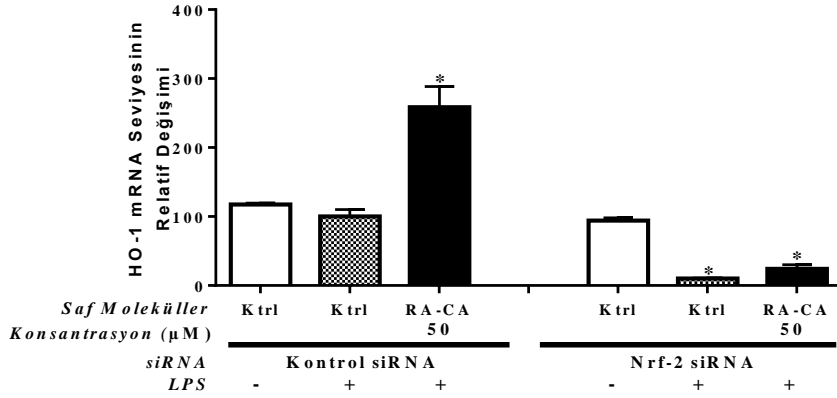
RAW264.7 makrofaj hücrelerinde RA-CA' nın Nrf-2 aracılığıyla kronik inflamasyona karşı koruyucu mekanizmasının aydınlatılması için gen sessizleştirme yöntemi kullanılmıştır. Buna göre RA-CA' nın, Nrf-2 transkripsiyon faktörü aracılığıyla regülasyonları sağlanan ve inflamatuvar yanıtta koruyucu etki gösteren antioksidan enzimlerin mRNA seviyeleri üzerine etkileri belirlenmiştir.

LPS ile inflamasyonun indüklendiği makrofaj hücrelerinde Nrf-2 protein seviyesi LPS kontrol grubunda % 27 oranında azalmıştır. Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde, kontrol siRNA grubuna kıyasla Nrf-2 siRNA grubunda ekspresyon seviyesinin anlamlı derecede azalması (% 100) Nrf-2 geninin sessizleştirildiğini göstermektedir ($p<0,05$), (Şekil 4.43).



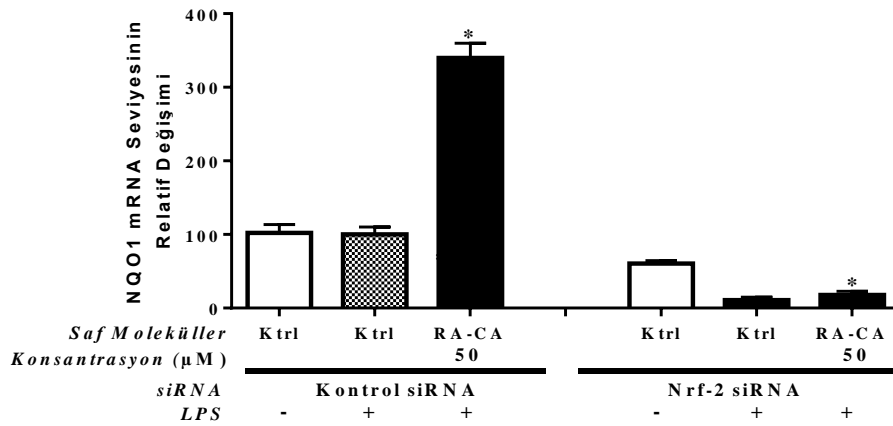
Şekil 4.43. Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde RA-CA' nın Nrf-2 mRNA seviyesi üzerine etkileri. * Kontrol siRNA (+) LPS kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)

Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde, RA-CA' nın 50 µM dozda uygulamasının kontrol siRNA grubunda HO-1 mRNA seviyesini 2,6 kat artırdığı görülmüştür ($p<0,05$), (Şekil 4.44). Sessizleştirme yapılan Nrf-2 siRNA grubunda ise, Kontrol siRNA grubu RA-CA uygulamasına kıyasla bu indüklenmenin 10 kat daha az bir oranda olduğu görülmüştür. Şekil 4.44'de belirtilen uygulama grupları, kontrol LPS (-), kontrol LPS (+), RA-CA 50 µM şeklindedir. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır. Kontrol siRNA grubu Kontrol LPS (+) değeri % 100 olarak alınmıştır.



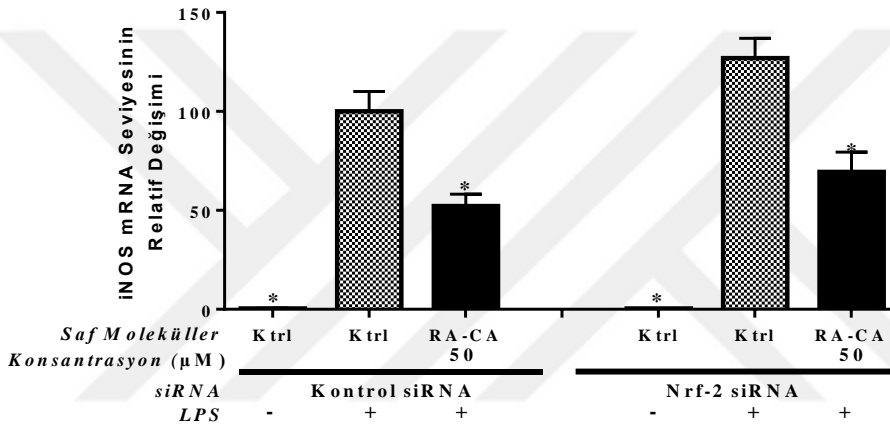
Şekil 4.44. Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde RA-CA' nın HO-1 mRNA seviyesi üzerine etkileri. * Kontrol siRNA (+) LPS kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde, RA-CA' nın 50 µM dozda uygulamasının kontrol siRNA grubunda NQO1 mRNA seviyesini 3,4 kat artırdığı görülmüştür (p<0,05), (Şekil 4.45). Sessizleştirme yapılan Nrf-2 siRNA grubu kontrol siRNA grubuna kıyaslandığında bu indüklenmenin gerçekleşmediği görülmektedir. Şekil 4.45'de belirtilen uygulama grupları, kontrol LPS (-), kontrol LPS (+), RA-CA 50 µM şeklindedir. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır. Kontrol siRNA grubu kontrol LPS (+) değeri % 100 olarak alınmıştır.



Şekil 4.45. Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde RA-CA' nın NQO1 mRNA seviyesi üzerine etkileri. * Kontrol siRNA (+) LPS kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir (p<0,05)

Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde, LPS uygulamasıyla (+) LPS grubunda iNOS mRNA seviyesinde görülen artış (% 100) bu hücrelerde inflamasyon modelinin geliştirildiğini göstermektedir ($p<0,05$). Kontrol siRNA grubunda RA-CA' nın 50 μ M dozda uygulaması ise, iNOS mRNA seviyesini 1,9 kat azaltarak inflamasyona karşı koruyucu etki sağlamıştır ($p<0,05$), (Şekil 4.46). Sessizleştirme yapılan Nrf-2 siRNA grubunda ise, Kontrol siRNA grubuna kıyasla azalmanın 1,3 kat arttığı görülmüştür ($p<0,05$). Şekil 4.46'da belirtilen uygulama grupları, kontrol LPS (-), kontrol LPS (+), RA-CA 50 μ M şeklindedir. Her bir uygulama triplike olarak yapılmıştır. Kontrol siRNA grubu kontrol LPS (+) değeri % 100 olarak alınmıştır.



Şekil 4.46. Nrf-2 siRNA ile gen sessizleştirilmesi yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde RA-CA' nın iNOS mRNA seviyesi üzerine etkileri. * Kontrol siRNA (+) LPS kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmektedir ($p<0,05$)

4.2. Tartışma

Çağımızın getirdiği ileri ve modern teknolojiyle beraber değişen yaşam tarzı örneğin fiziksel aktivitenin azalması, sürekli ve dengesiz beslenme, yüksek kalorili besinlerin kullanımı, gıdalarda bulunan katkı maddeleri metabolik kökenli hastalıkların görülme sıklığını oldukça artırmıştır. Bunların en önemlilerinden biri olan MetS, insülin direnci, dislipidemi, hipertansiyon ve abdominal obezite gibi birçok metabolik bozukluğun da bir arada görüldüğü, T2D ve kardiyovasküler hastalıklarla yakından ilişkili olan multi-faktöriyel bir hastalıktır (Şekil 4.47). Bu hastalık tüm dünyada yetişkin nüfusun önemli bir kısmını etkileyen yüksek bir prevalansa sahiptir (Xia ve Weng, 2010; Lam ve LeRoith, 2015).



Şekil 4.47. Metabolik sendromla ilişkili metabolik bozukluklar

MetS gelişiminin önlenmesi ve tedavisi için farmakolojik ve farmakolojik olmayan birtakım terapötik stratejiler kullanılmaktadır. Bu stratejilerin başında tedavi sürecine büyük oranda katkı sağlayan yaşam tarzı değişiklikleri yer almaktadır. Pek çok birey bu yaklaşımı benimsemekte güçlük çekmekte, bu nedenle de farmakolojik yaklaşımlara yönlendirilmektedir. Ancak, birden fazla metabolik bozukluğa karşı uzun süreli, çok sayıda ilaç kullanımı ve oluşan yan etkiler bireyleri farklı tedavi stratejilerinin arayışına sokmaktadır. Özellikle, fenolik bileşiklerce zengin doğal ürünleri içeren diyetel düzenlemeler tedavide sıkça tercih edilen alternatiflerdir (Vinayagam ve ark., 2016). Literatürde flavonoidlerin ve polifenolik asitlerin yüksek oranda bulunduğu doğal ürünlerce zengin diyet ile hastalıkların engellenmesi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Pek çok bitki ekstratının ve içeriğindeki aktif bileşenlerin MetS patojenezinde yer alan birden çok mekanizma üzerinde etkin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, *Cinnamomum cassia* bitkisinden saflaştırılan Sinnamon bileşeninin antihiperglisemik ve antihipertansif etkiye sahip olduğu (Kim ve ark., 2006; Preuss ve ark., 2006); *Artemisia dracuncululus* ekstratının ve içeriğindeki aktif bileşenlerin hepatik glukoz çıkışını baskılayarak hipoglisemik etkiye sahip olduğu, aynı zamanda insülin hassasiyetini artırdığı (Ribnicky ve ark., 2006; Wang ve ark., 2008); *Trigonella foenum-graecum* bitkisi tohumlarının antihiperglisemik ve antihiperkolestrolemik etki sağladığı rapor edilmiştir (Srinivasan ve ark., 2006; Graf ve ark., 2010). *Vitis vinifera* bitkisiyle yapılan *in vivo* bir çalışmada, bu bitkinin plazma kolesterol seviyesi üzerinde düzenleyici etkiye sahip olduğu gösterilirken (Quesada ve ark., 2009), 2009'da MetS'li bireylerle yapılan klinik çalışmada ise aynı bitkinin güçlü şekilde antihipertansif etki sağladığı rapor edilmiştir (Sivaprakasapillai ve ark., 2009; Graf ve ark.,

2010). Literatürde yer alan diğer çalışmalarda flavonoidlerin, (i) hepatositlerde glukoz metabolizmasının regülasyonu aracılığıyla hiperglisemiyi iyileştirmesi, (ii) pankreatik beta hücrelerinde apoptozisi azaltarak insülin salınımını artırması, (iii) adipositlerde ve iskelet kasında insülin hassasiyetini artırması, (iv) iskelet kası ve adipoz dokuda glukoz alımını artırması, metabolik olarak aktif pek çok dokuda farklı sinyal yolları üzerinde düzenleyici etkisi olduğunu açıkça göstermektedir (Babu ve ark., 2013). Dolayısıyla, bu çalışmalarda olduğu gibi bitkisel kökenli preparatların ya da aktif bileşenlerin metabolik etkilerinin aydınlatılması ve standardizasyonlarının sağlanması, MetS gibi kompleks hastalıkların tedavisinde kullanımlarını mümkün kılabilir.

Günümüzde MetS tedavisinde kullanılan multihedef tek bir farmakolojik ajan yoktur. Bu nedenle, hastaların büyük bir çoğunluğunda, bütün MetS komponentlerini tek tek hedef alan farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır (Nammi ve ark., 2009). Ne yazık ki bu yaklaşım hastaları uzun yıllar veya kimi zaman ömür boyu çok sayıda ve çok çeşitli ilaç kullanımına mahkum etmektedir. Buda ilerleyen süreçte, karaciğer toksisitesi, böbrek hasarı gibi ağır yan etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Lender ve Sysko, 2006). Bu nedenle, bitkisel kökenli multi-hedef geleneksel yaklaşımların araştırılması, ortaya koyulması ve daha az yan etkiye sahip multi-hedef etken fitokimyasalların tespit edilmesi son derece önemlidir.

Bu tez çalışmasında, geniş bir şifalı bitkiler kaynağı bulunan ülkemizin kültüründen yola çıkılarak, MetS tedavisinde aday olabilecek aktif bitki ekstratları ve aktif fitokimyasalların ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, proje kapsamında çalışılan bitki türü, Çanakkale ve yakın çevresinde (Bayramiç, Ayvalık, Kazdağları, Bandırma, Balıkesir ve Edremit) gerçekleştirilen etnobotanik çalışmalarda ele alınan bitkiler tek tek taranarak belirlenmiştir. Halk arasında şeker hastalığı, yüksek tansiyon, kalp ve damar hastalıklarının tümünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan “Karabaş otu” MetS’nin tüm bileşenlerini hedef alan bir bitki türü olarak seçilmiştir.

Tez çalışmasında, Karabaş otu sulu ekstresinin MetS’ ye karşı potansiyel iyileştirici etkileri ve moleküler mekanizmaları *in vitro* hücre tabanlı deneysel (*in vitro* cell based assay) yöntemler kullanılarak ilk defa araştırılmıştır. Aynı zamanda çalışmada elde edilen sulu ekstrenin biyoaktivite rehberli tarama çalışmaları sonucu aşamalı olarak fraksiyonlanmasıyla içeriğindeki MetS’ya karşı etkin “aktif moleküller” tespit edilmiş, bunların fizyolojik etkileri ve moleküler mekanizmaları hücre tabanlı *in vitro* yöntemler kullanılarak aydınlatılmıştır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında, Karabaş otu sulu demlemesinden elde edilen EE ve BE'nin hücre içi glukoz alımı, glukoz tüketimi ve glukoneojenik glukoz üretimi gibi fizyolojik parametreler üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Bölüm 1'de ayrıntılı şekilde bahsedildiği üzere, iskelet kası, vücutta insülinle uyarılan glukoz alımının % 80 oranında gerçekleştiği organdır. Plazma glukozun artışına yanıt olarak salınan insülinin hücrede başlattığı sinyalizasyon sonucu glukoz hücre içine alınarak ya enerjiye çevrilir ya da ihtiyaç olmaması durumunda glikojen olarak depolanır. Sistemik insülin direncinin, temel olarak iskelet kasında insülin aracılığı glukoz alımını sınırladığı bilinmektedir. Serbest yağ asitleri ile indüklenen insülin direnci durumunda kas hücrelerinde glukoz alımının önemli oranda azaldığı daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (Dresner ve ark., 1999; Griffin ve ark., 1999). Bu çalışmada, Karabaş otu sulu demlemesinden elde edilen BE ve EE'nin C2C12 iskelet kası hücrelerindeki glukoz alımında istatistiksel olarak anlamlı önemli artışlar (sırasıyla % 97-78 ve % 120-182) yarattığı tespit edilmiştir. Ekstratların iskelet kası hücrelerindeki glukoz alımı üzerindeki etkileri, kandaki glukoz homeostazını dengelemede piyasada yaygın kullanılan ve etkili bir ajan olan metformine (2 mM) çok yakın, hatta EE'de (50 µg/mL) bu oranın metformine kıyasla % 50 daha fazla olduğu görülmüştür.

Kandaki glukoz homeostazının dengelenmesinde karaciğer hücrelerinin önemli rolü vardır. Karaciğer bu işlevini, i) depo glikojenin hidrolize edilerek glukoz molekülüne dönüştürüldüğü glikojenoliz ile, ii) glukozun karbonhidrat olmayan kaynaklardan (pürivat, laktik asit, aminoasitler gibi) üretildiği glukoneojenez yolağıyla gerçekleştirmektedir. Glukoneojenez vücutta başlıca -% 85 oranında- karaciğerde gerçekleşmektedir. Özellikle glukoneojenez karaciğerin uzun süreli açlık durumlarında kandaki glukoz seviyesini dengelemek için kullandığı en önemli mekanizmalardan biridir. Normal şartlar altında, hepatik glukoneojenik glukoz üretimi insülin tarafından inhibe edilerek plazmaya glukoz çıkışı engellenir. Ancak hiperglisemik, insülin dirençli ya da T2D hastalarında bu inhibisyon mekanizması düzgün çalışmadığı için karaciğer glukoneojenezle glukoz üretmeye devam eder, bu da hasta bireylerde kandaki glukoz oranının sürekli yüksek kalmasına neden olur. Günümüzde yeni anti-hiperglisemik moleküllerin araştırılmasında glukoneojenik glukoz üretimini baskılama (inhibe etme) potansiyeli araştırılan en önemli mekanizmalardan biridir (Cheng ve ark., 2012; Govorko ve ark., 2007; Rojo ve ark., 2012; Waterman ve ark., 2015). Bu nedenle, çalışma kapsamında elde edilen ekstratlar, karaciğerdeki glukoneojenik glukoz üretimini baskılama potansiyelleri açısından değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre glukoneojenik glukoz üretimini baskılama açısından en etkin ekstratın pozitif kontrole (metformin) en yakın değerleri veren EE (% 82-87) olduğu

görülmektedir. C2C12 hücrelerinde elde edilen glukoz alımı sonuçları, H4IIE hücrelerinde elde edilen glukoneojenik glukoz üretimi sonuçlarına benzer olarak en etkin/aktif ekstratın EE olduğunu göstermiştir. Fizyolojik etki çalışmaları sonuçlarına bakıldığında en etkin ekstratın EE olduğu görülmüştür.

Normal şartlarda, uzun süreli açlık koşullarında hepatik hücrelerde piruvat, laktat gibi karbonhidrat olmayan kaynaklardan glukoneojenez yolağı ile glukoz üretilerek dolaşıma salınır ve enerji sağlanır. Bu açlık koşullarında işleyen doğal bir mekanizmadır. Ancak tokluk durumunda kandaki glukoz oranı artınca insülin uyarısı ile birlikte hepatik hücreler bu glukoneojenik glukoz üretimini glukoneojenez yolağında yer alan hız sınırlayıcı enzimler olan PEPCK ve G6Paz enzimlerini baskılayarak durdurular. İnsülin direnci ve beraberinde gelişen tip 2 diyabet koşullarında ise, hedef hücreye glukoz alımı sınırlı olduğundan glukoneojenez yolağındaki modulator enzimlerden PEPCK ve G6Paz'ın seviyelerinin artmasıyla glukoneojenez yolağı aktive olur ve sonuçta plazmadaki glukoz konsantrasyonu oldukça artar (Hall ve Granner, 1999; Quinn ve Yeagley, 2005). Bu nedenle, glukoz homeostazının dengelenmesinde glukoneojenez yolağında görev alan enzimlerin seviyelerinin baskılanarak hepatik hücrelerden glukoz çıkışının azalması önemlidir. Çalışmada, EE ve BE'nin hepatik hücrelerde gerçekleşen glukoneojenik glukoz üretimi üzerine etkileri (fizyolojik etki) değerlendirildikten sonra, bu yolaktaki etkisini nasıl gösterdiği, yani hız sınırlayıcı anahtar enzimlerden PEPCK ve G6Paz'ın ekspresyon seviyelerini baskılayıp baskılamadığı araştırılmıştır. Hepatik hücrelerde indüklenen glukoneojenez yolağında seviyeleri artan regülatör enzimlerin (PEPCK ve G6Paz), ekstratların uygulamasıyla mRNA ekspresyonlarında önemli düşüşler kaydedilmiştir. Özellikle, fizyolojik etki çalışmalarında yüksek aktivite gösteren EE'nin G6Paz mRNA ekspresyonunu baskılayarak glukoneojenik glukoz üretimini azalttığı söylenebilir.

Elde edilen ekstratlarla fizyolojik boyutta ve gen ekspresyon seviyesinde gerçekleştirilen çalışmaların ardından yapılan protein analizlerinde, insülin sinyalizasyonunda kritik rol oynayan moleküllerin seviyelerindeki değişimler araştırılmıştır. Bunların en önemlilerinden biri olan AKT proteini gerek karaciğer hücrelerinde gerekse de perifer hücrelerde insülin sinyalizasyonunda merkezi rol oynayan bir proteindir. Bu molekül insülin uyarısıyla 473. serin kalıntısından fosforile (p-AKT) olarak sinyalizasyonda birçok metabolik yolağın aktivasyon ya da inhibisyonunu gerçekleştiren merkezi role sahip bir moleküldür. Örneğin, insülin sinyali ile karaciğer hücrelerinde glukoneojenezi inhibe ederken, glikojen ve lipid sentezi yollarını aktive etmektedir. Palmitik asit ile geliştirilen insülin direncinde modellerinde AKT

fosforilasyonun ve aktivitesinin azaldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Schmitz-Peiffer, 2000; Martins ve ark., 2012). En son 2014 yılında Nutrition dergisinde yayınlanan bir makaleyle tıbbi bitkilerden elde edilen ekstratların ve ekstratların insülin direnci ve hiperglisemiye karşı etkinliklerinin taranmasında p-AKTSer473/AKT oranındaki artışın etkin bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir (Boudreau ve ark., 2014). Ayrıca, p-AKTSer473 seviyesinin azalması hücrelerde insülin direnci modelinin etkin bir şekilde oluşturulduğunu göstermek için biyomarkör olarak da kullanılmaktadır (Hirabara, 2012). Çalışmamızda, SYA uygulaması yapılan her iki hücre hattında (C2C12 ve H4IIE), uygulama yapılmayan gruba kıyasla p-AKTSer473/AKT oranında anlamlı bir azalma (% 24-% 27) tespit edilmiştir. AKT proteinin aktivasyonundaki bu azalma, glukoz alımı deneyinde (+) SYA kontrol grubundaki azalışa paralel şekildedir, dolayısıyla bu hücrelerde insülin direncinin geliştiği hem fizyolojik hem de moleküler seviyede doğrulanmıştır. EE ve BE'nin azalan p-AKTSer473 seviyesini iskelet kası hücrelerinde (% 32-59) ve hepatik hücrelerde (% 8-20) değişen oranlarda artırması, insülin direnci ve hiperglisemiye karşı oldukça etkin olduklarını ifade etmektedir. Elde edilen tüm bu sonuçlar ekstratların hem iskelet kası hücrelerinde, hem de hepatik hücrelerde insülin hassasiyetini artırdığını göstermektedir.

İskelet kasında insülinle uyarılan glukoz alımı, insülin sinyalizasyonu sonucu glukoz taşıyıcısının (GLUT4) hücre içinden plazma membranına translokasyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir (Watson ve ark., 2004). Ancak, lipit metabolizmasında meydana gelen bozukluklar sonucu plazmada bulunan serbest yağ asitlerinin miktarının artması, periferik insülin direnci gelişimine neden olarak GLUT4 translokasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Boden ve ark., 2006). Çalışmada, SYA ile insülin direnci geliştirilen iskelet kası hücrelerinde % 43 oranında azalan GLUT 4 protein seviyesinin EE ve BE 50 µg/mL dozunda sırasıyla % 14 ve % 50 oranlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir. AKT ve GLUT4 moleküllerinin glukoz homeostazındaki önemli rollerinden dolayı ekstratların insülin hassasiyetini artırdığı söylenebilir.

Tirozin kinazların subfamilyasına ait insülin reseptörü iki α , iki β subüniteden oluşan tetramerik yapıda allosterik bir proteindir. Normal durumda insülin reseptör α subünitesi, β subünitesinin tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder. Ancak, α subünitesine insülin bağlandığında kinaz aktivitesi üzerindeki inhibisyon kalkar ve β subünitesinin transfosforilasyonu kinaz aktivitesi artar ve hücrel moleküllerin fosforilasyonu katalizlenir (Saltiel ve Kahn, 2001). Elde ettiğimiz ekstratların sinyal yolağının ilk aşamasında yer alan bu molekül üzerine etkilerine baktığımızda, her iki hücre hattında da

(hepatik, iskelet kası) insülin direnci geliştirilen gruba kıyasla değişen oranlarda artış görülmektedir. Sonuç olarak, ekstratların insülin bağlanması ardından sinyal iletiminin başlama potansiyelini artırdığı söylenebilir.

İnsülin reseptör substrat-1 (IRS-1) proteini, insülin sinyal yolağında IR- β proteininin alt basamağında yer almaktadır. IRS-1 proteini farklı bölgelerde yer alan serin ve tirozin aminoasitlerinin fosforilasyonu ile aktive ve deaktive olmaktadır. Sinyal iletiminde insülin direnci gelişen hücrelerde 307. serin kalıntısının fosforilasyonu artarken, insüline duyarlı hücrelerde 632. tirozin kalıntısının fosforilasyonu artmaktadır. Bu molekülün serin kalıntılarındaki fosforilasyonunun artışı insülin direncinin gelişimine neden olur. İskelet kası hücrelerinde, insülin direnci gelişen grupta % 57 oranında artan Ser307 fosforilasyonu ekstratların uygulamalarıyla azalmış ve kontrol seviyelerine gerilemiştir.

Protein seviyesinde bakılan bir diğer parametre lipoprotein lipaz (LPL) enzimidir. LPL endotel hücrelerin luminal yüzeylerine heparan sülfat proteoglikanları ile bağlı bulunmaktadır. LPL enziminin aktivitesi, triglisertilerin plazmadan hücre içine alınımında hız sınırlayıcı bir faktördür. Enzim dolaşımında yer alan triglisertice zengin lipoproteinlerin konsantrasyonlarını düzenlemesinde rol oynar. LPL' nin ekspresyon seviyesindeki azalmanın, metabolik sendrom komponentlerinden dislipidemiye katkıda bulunduğu, insülin direnci gelişimine öncülük ettiği ve insülin hassasiyetinin bozulmasına neden olduğu bilinmektedir (Shibasaki ve ark., 2006). Hepatik ve iskelet kası hücreleriyle yapılan çalışmalarda LPL proteinin SYA gruplarında benzer oranlarda anlamlı şekilde azaldığı, azalan protein seviyesinin ekstratların (EE ve BE) uygulamalarıyla özellikle iskelet kası hücrelerinde % 38-92 arası oranlarda arttığı görülmüştür. Dolayısıyla, bu enzimin seviyesinin ekstratların uygulamasıyla artması, metabolik sendrom bileşenlerinden obezite ve diyabette görülen hiperlipidemide azalan LPL protein seviyesini iyileştirdiği yönündedir.

Hepatik hücrelerde GLUT2 proteini glukozun içeri alınmasında rol alan taşıyıcı proteindir. Karaciğer ve pankreas hücrelerinde ifade edilen GLUT2 proteininin regülasyonu esas olarak insülinle değil, glukoz gradiyentiyle düzenlenir. GLUT2, hepatositlerde hücre içi glukozun fosforilasyonu ve defosforilasyonu arasındaki dengeye bağlı olarak glukozun akış yönü ve oranıyla fizyolojik olarak kontrol edilir. İnsülin glukokinaz uyarısıyla hepatik glukoz akışını sağladığından dolaylı olarak GLUT2 ekspresyonunun düzenlenmesinde de etkisi vardır (Leclercq ve ark., 2007). Çalışmada hepatik hücrelerde SYA uygulamasıyla % 25 oranında azalan GLUT2 proteinin seviyesinin, özellikle iki ayrı dozda EE'nin uygulamaları sonucu, % 12-26 arası oranlarda

arttığı görülmüştür.

PPAR- γ , glukoz ve lipit homeostazının sağlanmasında rol oynayan önemli bir koaktivatördür. Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda PPAR- γ 'nın iskelet kasında GLUT4 molekülünün gen seviyesini güçlü şekilde indükleyerek glukozun hücre içerisine alınmasını artırdığı gösterilmiştir (Michael ve ark., 2001). Bu etkisi nedeniyle PPAR- γ molekülüne agonist bileşiklerin keşfedilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar literatürde mevcuttur (Guo ve ark., 2006). Diğer bir deyişle, agonist moleküller insülin hassasiyetinin bozulmasıyla azalan PPAR- γ seviyesini artırarak, insülin direnci kaynaklı gelişen tip 2 diyabette iyileştirici bir etki göstermektedir. Verilere bakıldığında, iskelet kası hücrelerinde insülin direnci gelişimiyle PPAR- γ protein seviyesi % 57 oranında azalmakta ancak, EE'nin 50 $\mu\text{g/mL}$ dozunun uygulamasıyla bu oran % 27' lik bir artış göstermektedir. Hepatik hücrelerde ise, EE'nin 50 $\mu\text{g/mL}$ dozunun glukoz homeostazının sağlanmasında rol oynayan PPAR- γ 'nın seviyesini eski değerlere geri çevirmesi kas hücrelerindeki sonuçları desteklemektedir. Dolayısıyla bu sonuçlar, bu ekstratın içeriğinde PPAR- γ agonisti olabilecek bileşiklerin var olduğunu göstermektedir.

Bitkilerde bulunan bileşiklerin glukoz ve lipit metabolizmasında bir takım mekanizmaları etkileyerek, antidiyabetik ve antilipidemik özellik gösterdiği bilinmektedir (Haddad ve ark., 2012). Ekstratlarla gerçekleştirilen fizyolojik etki çalışmaları ve moleküler analizlerin sonucunda EE yüksek etkinlik göstermesi nedeniyle **aktif ekstrat** olarak seçilmiştir.

Biyoaktivite rehberli fraksiyonlama yönteminin izlendiği çalışmada aktif ekstrat olarak seçilen EE kromatografik yöntemler kullanılarak 12 fraksiyona ayrılmış ve bu fraksiyonlardan aktif olanlarının belirlenmesi amacıyla tarama testlerine tabi tutulmuşlardır. Tarama testlerinde ilk ele alınan parametre hepatik glukoneojenik glukoz üretimidir. Glukoz homeostazının dengelenmesinde son derece önemli olan bu yolağın ve regülasyonundan sorumlu enzimlerin baskılanması hepatik hücrelerden glukoz çıkışının azalmasını dolayısıyla hiperglisemiyi kontrol altına almaktadır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, 12 fraksiyon arasından E4-E12 fraksiyonlarının glukoneojenik glukoz üretimini anlamlı oranlarda (% 40-69) baskıladığı görülmüştür.

E4, E8, E9, E10, E11 ve E12 fraksiyonları (25 $\mu\text{g/mL}$) bu yolda hız sınırlayıcı olarak yer alan PEPCCK enziminin gen ifadesini % 27-91 arasında baskılarken; E5, E7, E8, E9, E10, E11 ve E12 fraksiyonları (25 $\mu\text{g/mL}$) G6Paz enziminin gen ifadesini % 19-99 arasında baskılamıştır.

EE alt fraksiyonlarıyla yapılan tarama testlerinin devamında ise, bu fraksiyonların AKT aktivasyonu ve LPL ifade seviyesi üzerine etkileri bakılmıştır. AKT aktivasyonu insülin sinyalizasyonundaki merkezi rolü nedeniyle seçilmiş olup E9 fraksiyonunun bu değeri % 69 oranında artırdığı bulunmuştur. Plazmadan aterojenik lipoproteinleri süpürerek bunların yapısında bulunan yağ asitlerinin hücre içerisine alınmasını sağlayan LPL protein seviyesi E4, E5, E6, E8, E9 ve E10 fraksiyonlarının 25 µg/mL dozunda anlamlı şekilde artmakta, ancak en fazla artış (% 63) E9 fraksiyonunda görülmektedir.

EE alt fraksiyonlarının (E1-E12) insülin direnci ve dislipidemiye karşı potansiyel etkinlikleri 5 ayrı parametre kullanılarak, kontrollü ve tekrarlı deneylerle yukarıda anlatıldığı gibi taranmıştır. Etkin fraksiyon seçiminde en az 3 parametrede % 50 ve üzerinde beklenen değişim gösteren fraksiyonlar “aktif fraksiyon” olarak seçilmiş, etken madde aydınlatma ve saflaştırma çalışmalarına bu fraksiyonlar kullanılarak devam edilmiştir. Sonuçlara göre E8, E10 ve E11 en az üç parametrede hedeflenen etkiyi gösterirken, **E9 fraksiyonu** tüm parametrelerde hedeflenen etkiyi yüksek oranlarda sağlayarak **en etkin fraksiyon** olarak belirlenmiştir. Aktif olduğu belirlenen fraksiyonların içeriğinde bulunan maddeler tanımlanmış ve NMR analizleri yapılmıştır. E8 fraksiyonundan rosmarinik asit, kafeik asit, luteolin, luteolin 7-glukozit, propanoik asit metil ester; E9 fraksiyonundan rosmarinik asit, benzoik asit, E10 fraksiyonundan apigenin-7-glukozit, kafeoyl rosmarinik asit bileşikler olmak üzere, etkin fraksiyonlardan flavonoid ve fenolik asit gruplarına ait toplamda 8 bileşik saflaştırılmıştır.

EE'nin içeriğindeki bileşenlerin aydınlatılmasının yanı sıra, GC-MS ile yapısında bulunan uçucu bileşen profilinin analizi de gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucunda yapılan kütüphane taramaları EE'nin heksanoik asit, benzil alkol, Verbenon, 2-feniletanol, sitronellik asit, 2-hidroksisineol, nerol, salisilik asit, dokosaheksaenoik asit, 8-metil-7-dodecen-1-ol asetat, retikulin, 6'metil, mirtenoik asit, derrisin, 1,1-dimetil-1,2,3,5,7,8,9,9a octahidro-benzosiklohepten-6-on, androstan-3-on, 17-dimetil-17 [(trimetilsilil)oksi]-O-metiloksime, 4,7,10,13,16,19-docosaheksaenoik asit, trimetilsilil ester, 3,4-dimethoksicinnamik asit, (6,6-dimetil-4 bisiklo [3.1.1] heptanil) metoksi trimetilsilan, vanillik asit, pinen, 3-trimetilsililoksi- benzil sinamat, 4-hidroksibenzoik asit, 3-(metiltio) benzoik asit, glisin, N-[(3α,5β,7α,12α)-24-oxo-3,7,12 tris [(trimetilsilil)oksi]kolan-24-yl]-, metil(10), 9(11)-B-homolanistadien, 5,8,11-eicosatrienoik asit, 13-cis-retinoik asit, trimetilsililester, 2-[4-metil-6-(2,6,6-trimetilsikloheks-1-enil) heksa-1,3,5-trienil] sikloheks-1-en-1-karboksialdehit, kolesta-5,7,9 (11)-trien-3-ol asetat, oleik asit maddelerini içerdiğini göstermiştir. Bu maddeler uçucu bileşiklerdir ve proje kapsamında

çalışılmamıştır.

Çalışmanın son aşamasında, Karabaş otunun EE içeriğindeki aktif fenolik bileşenler tanımlanmış, izole edilmiş ve bu bileşenlerin iskelet kası, karaciğer, adiposit, makrofaj ve pankreatik beta hücrelerinde MetS'ye karşı potansiyel iyileştirici etkileri ve mekanizmaları ortaya koyulmuştur.

MetS, T2D gibi hastalıklar etiyojisinde pek çok dejeneratif koşulun yer aldığı multi-faktöriyel kompleks hastalıklardır. Bu nedenle, piyasada bulunan tek bir hedefe yönelik ilaçlar bu hastalıkların tedavisinde çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Metabolik sendromun birden fazla bileşenini aynı anda hedef alan multi-hedef bir molekül henüz geliştirilmemiştir. Bunun yerine insülin direnci bileşenine karşı T2D tedavisinde kullanılan glukoneojenik glukoz üretimini baskılayan metformin, insülin salınımını artırıcı sulfonilüreler, PPAR- γ agonisti thiazolidinler reçete edilmektedir. İlerleyen aşamalarda ise dislipidemi, hipertansiyon ve obezite bileşenlerindeki ayrı ayrı hedef alan ilaçlar tedaviye dahil edilmektedir. Bu ilaçların pek çok yan etkileri vardır. Örneğin, her ne kadar metformin hipoglisemiyi ve kilo alımını artırmadan kandaki glukoz seviyesini etkin bir şekilde düşürse de bazı ciddi gastrointestinal yan etkileri söz konusudur (Rines ve ark., 2016). Ayrıca çoklu ilaç kullanımında ilaç-ilaç etkileşimlerinden doğacak pek çok olumsuz durum da söz konusu olabilmektedir. Ancak doğal kaynaklardan izole edilen fitokimyasallar genellikle multi-hedef etkinlik göstermektedir (Kunnumakkara ve ark., 2016). Hem multi-hedef etkinlikleri hem de doğal olmalarından dolayı yüksek etkinlik ve göreceli olarak düşük yan etkiyle ilişkilidirler. Bu nedenle, doğal ürünlerin yapısında bulunan metabolik sendromun etiyojisinde yer alan insülin direnci ve dislipidemisinin her ikisini birden hedef alan fitokimyasalların ortaya çıkarılması multi-hedef, yan etkisi düşük ilaç etken maddelerinin geliştirilmesi için son derece önemlidir.

T2D tedavisinde 50 yılı aşkın bir süredir kullanılan metforminin etki mekanizmalarından biri hepatik glukoneojenik glukoz üretimi ve bu yolakta rol alan hız sınırlayıcı enzimlerin ifadelerini baskılamasıdır. Tez çalışması kapsamında, Karabaş otundan izole edilen bileşiklerin bu mekanizma üzerine etkileri ayrıntılı bir şekilde ortaya koyulmuştur. Buna göre, Karabaş otu EE etkin fraksiyonlarından izole edilen tüm bileşikler 50 μ M dozda glukoz üretimini anlamlı oranlarda baskılamakta, RA, CA, PAME, A7G, RA-CA bileşiklerinde bu oran diğerlerine kıyasla daha yüksek seviyede -% 50' nin üzerinde (% 56-76)- bulunmuştur. Özellikle, Karabaş otu sulu özütünün içeriğinde ilk defa tanımlanan rosmarinik asit ve kafeik asit'in ester bağıyla bağlanması ile doğal olarak oluşan hibrit yapıdaki kafeoyl rosmarinik asit bileşiği glukoneojenik glukoz üretimini % 76

oranında ve metformine (% 116) en yakın oranda baskılamıştır. Bu oran, RA ve CA bileşikleri tek tek ele alındıklarında sırasıyla % 59 ve % 60 iken RA-CA bileşiğinde baskılamanın % 76' ya yükselmesi, molekülün hibrit yapıda daha etkin olduğunu göstermektedir. RA ve CA bileşikleri bitkilerin yapısında yaygın olarak bulunan ve antidiyabetik etkinlikleri üzerine pek çok çalışma yapılmış fenolik bileşiklerdir. Örneğin, *Smallanthus sonchifolius* bitkisinden saflaştırılan RA ve CA bileşiklerinin daha yüksek dozda (500 µM -10 kat yüksek) sıçan hepatositlerindeki (primer hücre kültürü) glukoneojenik glukoz üretimini % 50' ye yakın değerlerde baskıladıkları rapor edilmiştir (Valentova ve ark., 2007). Bir diğer çalışmada, RA' nın diyabetik sıçanlarda PEPCK ve G6Paz enzimlerinin seviyelerini baskılayarak (1.9-2.1 kat), glukoneojenik glukoz üretimini azalttığı gösterilmiştir (Jayanthi ve Subramanian, 2015). Bizim bulgularımızda, bu çalışmaları desteklemektedir. Ancak RA-CA hibrit bileşiğine baktığımızda, literatürde bu maddenin bitkilerin yapısında doğal olarak bulunabileceği ile ilgili sadece tek bir yayına rastlanmıştır. Bu yayında üç tane Ocium türünden (*O. minimum*, *O. africanum*, *O. basilicum*) izole edilen bu bileşik kafeoyl rosmarinik asit (Isomelitric acid A) olarak adlandırılmış ve hibrit molekül olarak tanımlanmıştır (Frag ve ark., 2016). İlk defa Frag ve ark'ları (2016) tarafından ve daha sonra da bu proje kapsamında tanımlanan RA-CA bileşiği ile ilgili (sentetik ya da doğal kaynaklı) yapılmış herhangi bir aktivite çalışması bulunmamaktadır. Bu anlamda, proje kapsamında RA-CA molekülü ile elde edilen bulgular oldukça çarpıcıdır ve ilk defa ortaya koyulmuştur.

Glukoneojenik glukoz üretiminde % 50' nin üzerinde baskılama gösteren molekülden LUT 50 µM dozda PEPCK ve G6Paz enzimlerinin ifadesini mRNA seviyesinde sırasıyla % 84 ve % 95 oranında baskılamıştır. Sıçan hepatik hücreleriyle yapılan bir çalışmada, ticari olarak temin edilen luteolinin, glukoneojenik PEPCK ve G6Paz enzimlerinin mRNA seviyelerini doza bağımlı olarak baskıladığı ve antihiperlipidemik etki sağladığı gösterilmiştir (Vogt ve ark., 2014). Çalışmamızda, RA ve CA bileşikleri PEPCK ve G6Paz enzimlerinin mRNA seviyesinde ifadesinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu sonuçlara benzer olarak yukarıda bahsedilen, *Smallanthus sonchifolius* bitkisinden saflaştırılan RA ve CA bileşiklerinin, PEPCK ve G6Paz enzimlerinin ifadesinde anlamlı değişimler yaratmadığı gösterilmiştir (Valentova ve ark., 2007). Ancak proje kapsamında izole edilen RA-CA hibrit molekülü PEPCK seviyesini % 20 oranında artırırken, G6Paz'ı % 22 oranında baskılamaktadır. Bileşiğin glukoneojenik glukoz üretimini baskılamakta gösterdiği yüksek aktivitenin kısmi olarak G6Paz'ı mRNA seviyesinde baskılamasından kısmi olarak da aşağıda ele aldığımız başka

mekanizmaları değiştirerek gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz. Yapılan bu tarama çalışmalarında, L7G ve BA bileşikleri bahsedilen parametreler üzerinde hiçbir etkinlik göstermediklerinden ileri mekanizma çalışmalarına dahil edilmemiştir.

Flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin glukoz ve lipit metabolizmasındaki normal işleyişi sağlayan birçok metabolik yolağın aktivasyonuna öncülük eden AKT molekülünün fosforilasyonunu artırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Costa ve ark., 2012; Vinayagam ve Xu, 2015; Alam ve ark., 2016). Proje kapsamında izole edilen RA, CA, LUT, A7G ve RA-CA bileşikleri insülin direnci modeli geliştirilen iskelet kası ve karaciğer hücrelerinde AKT aktivasyonunu (Ser 473 fosforilasyonu ile) önemli oranlarda artırmışlardır. Bu oran, iskelet kası hücrelerinde % 155-294 arasında değişirken karaciğer hücrelerinde % 10-90 arasında bulunmuştur. Literatürde LUT ile yapılan *in vitro* bir çalışmada, bu molekülün insülin direnci ile artan inflamatuvar yanıtta IKKB/IRS-1/Akt/eNOS-bağımlı yolak üzerinde AKT'yi aktive ederek iyileştirici etki gösterdiği ortaya konmuştur (Deqiu ve ark., 2011). CA ile yapılan iki *in vivo* çalışmada ise, CA' nın STZ ile indüklenen diyabetik ve yüksek yağlı diyetle beslenen obez farelerde AKT molekülünün fosforilasyonunu artırarak insülin duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (Jung ve ark., 2006; Bezerra ve ark., 2012). Ayrıca, CA' nın insülin direnci geliştirilen hepatik hücrelerde glukoz alımını artırdığı, insülin sinyal proteinlerinden insülin reseptörü, PI3K, glikojen sentaz, GLUT2, proteinlerinin upregülasyonlarını sağlayarak insülin direncini iyileştirdiği gösterilmiştir (Huang, 2009). Bir çeşit sinamik asit türevi olan RA'nın diyabetik ratlarda kan glukozunu ve HbA1c seviyesini azalttığı, plazma insülin seviyesini etkili şekilde artırdığı gösterilmektedir (Zhu ve ark., 2014; Jayanthi ve Subramanian, 2014; Govindaraj ve Sorimuthu Pillai, 2015). *In vitro* çalışmalar, RA' nın ince bağırsaktan glukoz emilimini sağlayan α -glukozidaz enzimini inhibe ettiğini göstermektedir. Bu inhibisyon RA' nın anti-hiperglisemik etkisini açıklayan bir mekanizma olabilir. Ancak, literatürde RA' nın insülin sinyalizasyonunda merkezi rolü olan AKT seviyesini nasıl değiştirdiğini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Proje kapsamında RA' nın insülin direnci modeli oluşturulan iskelet kası ve hepatik hücrelerde AKT aktivasyonunu sırasıyla % 170 ve % 79 oranında artırdığı tespit edilmiştir. Bu da literatürde RA ile ilgili olarak *in vivo* çalışmalarda gözlemlenen yüksek anti-diyabetik etkiyi açıklayan mekanizmalardan biri olabilir.

PPAR- γ aktivasyonunun iskelet kasında fonksiyonel adiponektinlerin salınımını sağlayabileceği, dolayısıyla insülin direnci ve glukoz homeostazının dengelenmesinde koruyucu etki sağladığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Amin ve ark., 2010). Seçici

PPAR- γ agonisti olan thiazolidindionlar (TZDs), insülin hassasiyetini iyileştirici ve glukoz homeostazını düzenleyen ajanlar olarak rol oynamaktadırlar. Ancak bu moleküller, hipoglisemi, ödem, kilo alımı ve kalp bozukluklarına neden olma gibi yan etkilere sahiptirler (Erdmann ve ark., 2009). Yapılan in vivo çalışmalar, bazı doğal ürünlerin (honokiol, amorfrutin 1, amorfrutin B, amorphastilbol) PPAR- γ 'yı aktive ederek diyabetik hayvan modellerindeki bazı parametreleri iyileştirdiklerini ve bunların thiazolidindionlar ile karşılaştırıldıklarında daha az yan etkiye sahip olduklarını göstermiştir (Wang ve ark., 2014'dan derlenmiştir). Çalışma kapsamında Karabaş otundan izole edilen RA, CA, LUT, PAME, A7G, RA-CA bileşiklerinin iskelet kası hücrelerinde PPAR- γ 'nın protein seviyesini % 49-223 arası oranlarda artırdığı görülmüştür. Özellikle, RA, CA, A7G, RA-CA bileşiklerinin PPAR- γ aktivasyonunda daha etkili oldukları tespit edilmiştir. Özellikle, tez çalışması kapsamında ilk defa izole edilen RA-CA molekülünün, PPAR- γ protein seviyesini % 99 oranında artırması, insülin hassasiyetini geliştirici etkisini ortaya koymaktadır.

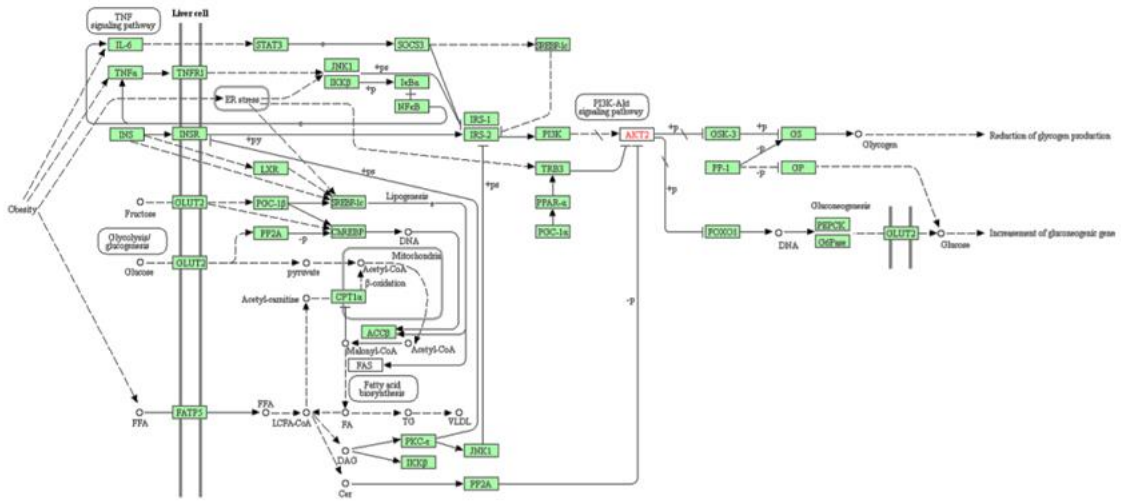
LPL gen ve protein seviyesinde insülinle regüle olmaktadır. İnsülin dirençli diyabetik hastalarda seviyesinin düştüğü bilinmektedir. Azalan LPL ifadesi, postprandial hiperlipidemi, insülin direnci ve dislipidemini karakteristiğidir (Ginsberg, 1991; Ginsberg ve ark., 2005). Çalışmada, uygulanan tüm saf bileşiklerin hepatik hücrelerde LPL seviyelerini anlamlı oranlarda (% 21-327) artırdığı görülmüştür. Bununda plazmada yer alan aterojenik lipoproteinlerin dolaşımdan süpürülerek karaciğere alınmasında dolayısıyla dislipidemini tedavisinde önemli rolü vardır.

İnsülin salınımının gerçekleştiği pankreatik beta hücreleri, glukoz homeostazının düzenlenmesinde oldukça önemli yere sahiptir. Bu nedenle, insülin salınımında gerçekleşen sıkıntılar T2D ve ilişkili hastalıkların gelişimine zemin hazırlamaktadır. Hiperglisemi durumu başlangıçta bu hücreler tarafından insülin salınımının artırılmasıyla telafi edilebilir ancak kronik duruma geçtiğinde beta hücrelerinde glukoz seviyesine olan hassasiyet bozularak hücrelerde fonksiyon kaybına neden olur. Bitkisel kökenli birçok molekülün beta hücrelerinden insülin salınımını artırdığı gösterilmiştir (Pinent ve ark., 2008; Stefkov ve ark., 2011; Bhattacharya ve ark., 2014). Proje kapsamında izole edilen bileşiklerin pankreatik insülin salınımı üzerine etkilerine baktığımızda; RA, LUT, PAME ve RA-CA bileşiklerinin salınımını anlamlı oranlarda artırdığı bulunmuştur. Ayrıca, aynı hücrelerde, CA'nın GLUT2 protein seviyesini pozitif kontrol olarak kullanılan Glibenklamid'den % 30 daha fazla dolayısıyla daha etkili bir şekilde artırdığı görülmüştür.

MetS'yi oluşturan bileşenlerin en önemlilerinden biri olan obezitenin görülme sıklığı

gün geçtikçe artmaktadır. Adipositlerin genişlemesi ve preadipositlerin adipositlere dönüşerek sayıca artmaları adipoz doku kütlelerinin aşırı artışına, dolayısıyla obeziteye neden olmaktadır (Schmid ve ark., 2005). Bu durumun, adiposit proliferasyonunu ve farklılaşmasını regüle eden mekanizmalara müdahale sonucu azaltılması mümkündür. Bazı araştırmalar, bitkisel kökenli biyoaktif bileşiklerin adipositlerde apoptozu artırdığını ve antilipolitik etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Rayalam ve ark., 2008; Wang ve ark., 2008; Kowalska ve ark., 2014). Tez çalışması kapsamında yapılan deneylerde adiposit hücrelerinden besiyerine salınan gliserol miktarının LUT, PAME ve RA-CA bileşikleriyle anlamlı oranlarda baskılandığı görülmüştür. Metformin de adipositlerde lipolizi baskılayarak dolaşımdaki serbest yağ asidi miktarının azalmasına ve insülin hassasiyetinin artmasını sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2008). Dolayısıyla, bu bileşikler gibi adipojenezin düzenlenmesinde etkili çeşitli bitkisel bileşenlerle zenginleştirilmiş diyetler ya da gıda takviyeleri obezite, insülin direnci ve ilişkili hastalıkların tedavisi açısından yararlı olabilir.

Aktif olduğu tespit edilen EE'nin, LUT, RA, CA ve hibrit yapıdaki RA-CA (kafeoyl rosmarinik asit) bileşiklerinin insülin direncine karşı etkileri ile ilgili elde edilen veriler sıçan karaciğer hücre hattında tüm genom transkriptom analizleri ile doğrulanmış ve genişletilmiştir. Bu çalışmalarla insülin direnci geliştirilen hücrelerde insülin sinyal yolağında rol alan genlerdeki değişimler saptanmıştır. Gen ekspresyonlarındaki değişimler tek başına yeterli bilgiyi sağlayamadığından, DAVID Biyoinformatik Veritabanı ve KEGG ile yolak analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analize göre, insülin direnci ve insülin sekresyonu, PPAR sinyalizasyonu, glukagon sinyalizasyonu ve PI3K-AKT sinyal yolakları önemli ölçüde etkilenmiştir. Tüm bu analizler, SYA uygulamasının, insülin direnci (10 gen), insülin sekresyon yolağı (8 gen), PPAR sinyal yolağı (10 gen), immün yanıt (22 gen) ve inflamasyonla (21 gen) ilgili bir grup genin SYA uygulaması yapılmayan kontrol grubuna kıyasla ekspresyonlarının artmasına ve azalmasına neden olduğunu göstermektedir (Şekil 4.48.). Bu sonuçlar, SYA uygulaması yapılan H4IIE hücrelerinde insülin direncinin geliştiğinin kanıtıdır. Yanı sıra, immün yanıtta, insülin sekresyonunda ve PI3K-Akt sinyal yolaklarında insülin direnci gelişimiyle değişen bu genlerin ekspresyonları, EE uygulamasıyla normal değerlerine geri dönmüştür. Bu bulgular, EE'nin hepatik hücrelerdeki insülin direncini tersine çevirdiğini, insülin sinyal yolağını ve glukoz metabolizmasını iyileştirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.48. SYA uygulanan hepatik hücrelerde TNF ve PI3K-Akt sinyal yolları için KEGG yolak analizi. + f fosforilasyonu, -p defosforilasyonunu ifade etmektedir

EE'nin yanı sıra incelenen aktif bileşiklerin tümü, karbonhidrat metabolizması ve insülin sinyalizasyonunda görev alan (glikojen, glukoneojenez, glikoliz yollarında yer alan yanı sıra insülin sinyalizasyonundaki protein kinazlar ve insülin reseptör substratları) genlerin seviyesinde serbest yağ asidi uygulamasıyla meydana gelen değişiklikleri kontrol seviyelerine çekerek insülin direncinde iyileştirici etki sağlamışlardır. Bununla beraber yağ asidi, sterol ve kolesterol metabolizmasından sorumlu genlerin seviyesinde de değişiklikler tespit edilmiştir. Bu sonuçlar gerçek zamanlı PCR ve Western blot çalışmalarını genişletici ve destekler niteliktedir. Ayrıca hem EE'nin hem de LUT, RA, CA ve hibrit yapıdaki RA-CA bileşiklerinin, metal taşınımı ve metabolizması, hücre migrasyonu, protein katabolizması, angiogenez, hücre döngüsü, enerji metabolizması, nükleotid metabolizması, ve DNA hasar tamir yolağı gibi değişik yolları değiştirdiği ile ilgili önemli veriler elde edilmiştir.

MetS patojenezine büyük oranda katkıda bulunan düşük seviyeli kronik inflamasyonun çeşitli mekanizmalarla engellenmesi, hastalığın gelişim süreci açısından önem taşımaktadır. EE'den elde edilen E6 fraksiyonunun ve bu fraksiyonun içeriğindeki apigenin ve luteolin moleküllerinin antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu, laboratuvarımızda 112T442 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında tamamlanan bir yüksek lisans tez çalışmasında gösterilmiştir (İpek, 2016). Bahsedilen tez çalışmasına paralel olarak, bu çalışmamızda RA-CA bileşiğinin antiinflamatuvar etki mekanizması gen susturma metodu kullanılarak ayrıntılı şekilde ortaya koyulmuştur. İnflamatuvar yanıtta Nrf-2 aktivasyonunun sağlanması, antioksidan özellikteki HO-1, NQO1 gibi enzimlerin ve CO,

Fe, biliverdin gibi moleküllerin salınımını artırarak, inflamatuvar yanıtı oluşturan unsurları (iNOS, NO, NF-kB) engelleyebilmektedir (Wakabayashi ve ark., 2010), (Şekil 1.19). Özellikle son yıllarda literatürde bitki ekstratı yada bitkilerden saflaştırılan bileşiklerin makrofaj hücrelerinde Nrf-2 aracılıklı anti-inflamatuvar etkilerinin ortaya koyulduğu birçok çalışma mevcuttur (Ryu ve ark., 2012; Chen ve ark., 2017; Jun ve ark., 2011). Bu çalışmalarda, Nrf-2 aracılığıyla regülasyonu sağlanan genlerin ekspresyon seviyelerinin artması inflamatuvar yanıtı karşı koruyucu etki sağladığı gösterilmiştir. Tez çalışması kapsamında ise, ilk kez Lamiaceae familyasından saflaştırılan RA-CA molekülünün Nrf-2 aracılıklı bir mekanizmayla HO-1 ve NQO1 enzimlerinin mRNA seviyelerini sırasıyla 2,6 ve 3,4 kat anlamlı şekilde artırdığı ortaya koyulmuştur. Yanı sıra, RA-CA' nın LPS uygulamasıyla inflamatuvar yanıtın tetiklendiği hücrelerde artan iNOS mRNA seviyesini anlamlı şekilde baskıladığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre, inflamatuvar yanıtın tetiklendiği makrofaj hücrelerinde, RA-CA molekülünün Nrf-2 aracılıklı bir mekanizmayla inflamatuvar yanıtı karşı koruyucu etki sağladığı görülmektedir. Nrf-2 siRNA ile bu genin susturulduğu hücrelerde ise, HO-1 ve NQO1 moleküllerinin mRNA seviyelerinde görülen azalmalar ve iNOS mRNA seviyesinde görülen anlamlı artış (1,3 kat), Nrf-2 aracılıklı regülasyonu sağlanan moleküllerin baskılayıcı etkisinin azaldığını açıkça göstermektedir. Bu çalışma literatürde yer alan bilgileri destekleyici niteliktedir (Wakabayashi ve ark., 2010).

BÖLÜM 5

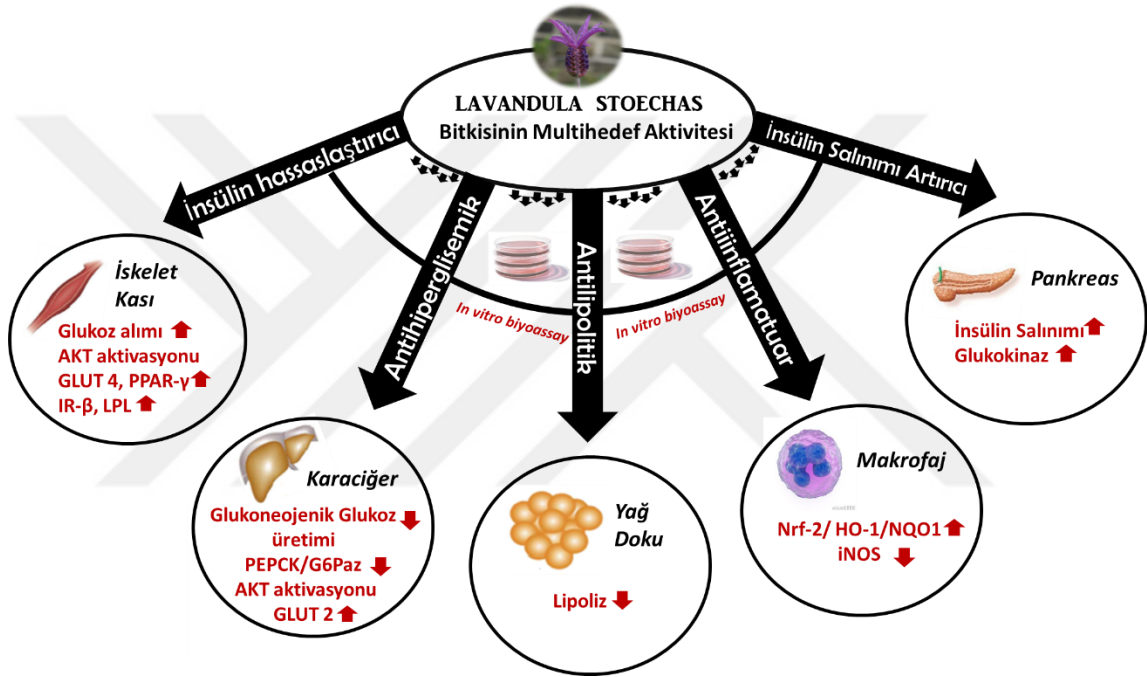
SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen fizyolojik, moleküler, transkripsiyonel ve saflaştırma çalışmaları, Karabaş otundan elde edilen EE ve bundan izole edilen fenolik bileşiklerin metabolik sendromun temel bileşenlerinden insülin direnci ve dislipidemiye karşı pek çok metabolik yolak üzerinden multi-hedef olarak etkin olabileceklerini göstermektedir.

112T442 no'lu TUBITAK projesi kapsamında bitkinin fenolik bileşik profili ilk defa aydınlatılmış, toplam 14 adet fenolik bileşik izole edilerek tanımlanmıştır. Bu bileşiklerden 8 tanesi biyoaktivite rehberli taramalar sonucu MetS komponentlerine karşı aktif olduğu belirlenen fraksiyonlardan saflaştırılmıştır. 4 hücre hattıyla yapılan fizyolojik ve moleküler seviyedeki biyoaktivite çalışmaları, bu bileşikler arasından Rosmarinik asit, Kafeik asit, Luteolin, Propanoik asit metil ester, Apigenin-7-glukozit ve Kaffeoyl rosmarinik asit bileşiklerinin insülin direnci ve dislipidemiye karşı etkin bileşikler olabileceğini göstermiştir. İnsülin direnci modeli geliştirilmiş sıçan karaciğer hücre hattıyla yapılan transkriptom analiz sonuçları EE başta olmak üzere, Rosmarinik asit, Kafeik asit, Luteolin ve Kaffeoyl rosmarinik asit bileşiklerinin tümünde karbonhidrat metabolizması ve insülin sinyalizasyonunda görev alan; yanısıra yağ asidi, sterol ve kolesterol metabolizmasından sorumlu genlerin seviyesinde değişiklikler olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar gerçek zamanlı PCR ve western blot çalışmalarını genişletici ve destekler niteliktedir. Her ne kadar BE'nin birçok parametre açısından biyoaktif bir ekstrat olduğu görülse de, bütçe ve zaman kısıtlamasından dolayı BE'nin fraksiyonlama ve aktivite çalışmaları yapılmamıştır.

Kafeik asit ve rosmarinik asitin ester bağıyla bağlanmasından oluşan hibrit yapıdaki Kaffeoyl rosmarinik asit doğada bu şekliyle nadir bulunan özgün bir moleküldür. Bu bileşik daha önce sadece üç adet Ocimum türünde tanımlanmıştır. Bileşikle ilgili yapılmış herhangi bir biyoaktivite çalışması bulunmamaktadır. Tez çalışması kapsamında bu bileşik ilk kez bir Lamiaceae familyasında tanımlanmış, izole edilmiş ve ilk kez insülin direnci ve ilişkili mekanizmalara karşı potansiyel biyoaktivitesi hücre tabanlı *in vitro* çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Sunulan analiz sonuçlarında, bu bileşiğin glukoneojenik glukoz üretimini ve G6Paz'ı baskıladığı, iskelet kası, karaciğer ve adipoz doku hücrelerinde AKT aktivasyonunu artırdığı, adipositlerde gliserol salınımını, iskelet kası ve adipoz doku hücrelerinde PPAR- γ aktivasyonunu artırdığı, Nrf-2 aracılıklı bir mekanizmayla inflamasyona karşı koruyucu olduğu görülmüştür. Diğer bir deyişle, metabolik sendrom

komponentlerinin bir çoğunun tedavisinde kabul gören moleküler ve fizyolojik hedeflerde aktif olduğu aydınlatılmıştır (Şekil 5.1). Ancak, bitkilerin içeriğindeki fenolik bileşenlerin, *in vitro* çalışmalarla ortaya koyulan potansiyel terapötik etkilerinin zayıf biyoyararlanım ve sınırlı çözünürlüklerinin olması ihtimaline karşılık *in vivo* pre-klinik ve klinik deneylerle desteklenmesi gereklidir. Bir sonraki aşama olarak bu molekülün, yapı-aktivite, ADME-TOX ve moleküler modelleme teknikleri ile farmakodinamik ve farmokokinetik açılarından optimize edilerek türevlendirilmesi ve *in vivo* hayvan modellerinde validasyonu hedeflenmektedir.



Şekil 5.1. *Lavandula stoechas* bitkisinin multihedef aktivitesi

KAYNAKLAR

- Abay G., Kılıç A. 2001. Pürenbeleni Ve Yanıktepe (Mersin) Yörelerindeki Bazı Bitkilerin Yöresel Adları ve Etnobotanik Özellikleri. *Ot Sistematik Botanik Dergisi*, 8(2): 97-104.
- Alam M. A., Subhan N., Hossain H., Hossain M., Reza H. M., Rahman M. M., Ullah M. O. 2016. Hydroxycinnamic Acid Derivatives: A Potential Class Of Natural Compounds for The Management of Lipid Metabolism and Obesity. *Nutrition & metabolism*, 13(1): 27.
- Alberti K. G. M. M., Zimmet P., Shaw J. 2006. Metabolic Syndrome A New World-Wide Definition. A Consensus Statement from The International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*, 23(5): 469-480.
- Alberti K. G. M. M., Zimmet P. F. 1998. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Provisional Report of A WHO Consultation. *Diabetic Medicine*, 15(7): 539-553.
- Alessi D., 2001. Discovery of PDK1, One of The Missing Links in Insulin Signal Transduction: Portland Press Limited.
- Amin R. H., Mathews S. T., Camp H. S., Ding L., Leff T. 2009. Selective Activation of PPAR γ in Skeletal Muscle Induces Endogenous Production of Adiponectin and Protects Mice from Diet-Induced Insulin Resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(1): E28-E37.
- Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S., Cabras P. 2006. Chemical Composition, Seasonal Variability, and Antifungal Activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Essential Oils from Stem/Leaves and Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12): 4364-4370.
- Araneta M. R. G., Wingard D. L., Barrett-Connor E. 2002. Type 2 diabetes and Metabolic Syndrome in Filipina-American women. *Diabetes Care*, 25(3): 494-499.
- Armoni M., Harel C., Karnieli E. 2007. Transcriptional Regulation of the GLUT4 Gene: from PPAR- γ and FOXO1 to FFA and Inflammation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(3): 100-107.

- Ayral N., 1997. *Lavandula stoechas* Bitkisinin Uçucu Yağının ve Uçucu Olmayan Organik Bileşenlerinin İncelenmesi ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Türkiye.
- Azimi-Nezhad M., Herbeth B., Siest G., Dadé S., Ndiaye N. C., Esmaily H., Hosseini S. J., Ghayour-Mobarhan M., Visvikis-Siest S. 2012. High Prevalence of Metabolic Syndrome in Iran in Comparison With France: What are The Components That Explain This? *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 10(3): 181-188.
- Babu P. V. A., Liu D., Gilbert E. R. 2013. Recent Advances in Understanding the Anti-diabetic Actions of Dietary Flavonoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(11): 1777-1789.
- Balkau B., Charles M.-A., 1999. Comment on the Provisional Report from the WHO Consultation. *Diabetic Medicine*, 16(5): 442-443.
- Baytop T., 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi Gecmisten Bugüne (Therapy with Medicinal Plants in Turkey. Past and Present, 169.
- Bezerra R. M. N., Veiga L. F., Caetano A. C., Rosalen P. L., Amaral M. E. C., Palanch A. C., & de Alencar S. M. 2012. Caffeic Acid Phenethyl Ester Reduces the Activation of the Nuclear Factor K β Pathway By High-Fat Diet-Induced Obesity In Mice. *Metabolism*, 61(11): 1606-1614.
- Bhargava P., Lee C.-H. 2012. Role and Function of Macrophages in the Metabolic Syndrome. *Biochemical Journal*, 442(2): 253-262.
- Bhattacharya S., Oksbjerg N., Young J., & Jeppesen P. 2014. Caffeic Acid, Naringenin And Quercetin Enhance Glucose-Stimulated Insulin Secretion and Glucose Sensitivity in INS-1E Cells. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 16(7): 602-612.
- Bilous R., Donnelly R. 2010. *Handbook of diabetes*: John Wiley & Sons.
- Bloch-Damti A., Bashan N. 2005. Proposed Mechanisms for the Induction of Insulin Resistance by Oxidative Stress. *Antioxidants & redox signaling*, 7(11-12): 1553-1567.
- Boden G., Chen X., Capulong E., Mozzoli M. 2001. Effects of Free Fatty Acids on Gluconeogenesis and Autoregulation of Glucose Production in Type 2 Diabetes.

- Diabetes, 50(4): 810-816.
- Boudreau A., Cheng D. M., Ruiz C., Ribnicky D., Allain L., Brassieur C. R., Turnipseed D. P., Cefalu W. T., Floyd Z. E. 2014. Screening Native Botanicals for Bioactivity: An Interdisciplinary Approach. *Nutrition*, 30(7): S11-S16.
- Bryant N. J., Govers R., James D. E. 2002. Regulated Transport of the Glucose Transporter GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(4): 267-277.
- Bulut Y., 2006. Manavgat (Antalya) yöresinin faydalı bitkileri. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Türkiye.
- Bumke-Vogt C., Osterhoff M. A., Borchert A., Guzman-Perez V., Sarem Z., Birkenfeld A. L., Bähr V., Pfeiffer A. F. 2014. The Flavones Apigenin and Luteolin Induce FOXO1 Translocation but Inhibit Gluconeogenic and Lipogenic Gene Expression in Human Cells. *Plos One*, 9(8): e104321.
- Cahill Jr G. F., 2006. Fuel Metabolism in Starvation. *Annu. Rev. Nutr.*, 26: 1-22.
- Cameron A. J., Shaw J. E., Zimmet P. Z. 2004. The Metabolic Syndrome: Prevalence In Worldwide Populations. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 33(2): 351-375.
- Cavanagh H., Wilkinson J., 2002. Biological Activities of Lavender Essential Oil. *Phytotherapy research*, 16(4): 301-308.
- Cefalu W. T., Ye J., Zuberi A., Ribnicky D. M., Raskin I., Liu Z., Wang Z. Q., Brantley P. J., Howard L., & Lefevre M. 2008. Botanicals and the Metabolic syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(2): 481S-487S.
- Ceriello A., 2000. Oxidative Stress and Glycemic Regulation. *Metabolism*, 49(2): 27-29.
- Ceriello A., Motz E. 2004. Is Oxidative Stress The Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(5): 816-823.
- Chen J.-Y., Zhu G.-Y., Su X.-H., Wang R., Liu J., Liao K., Ren R., Li T., Liu L. 2017. 7-Deacetylgedunin Suppresses Inflammatory Responses Through Activation of Keap1/Nrf2/HO-1 Signaling. *Oncotarget*, 8(33): 55051-55063.

- Cheng D. M., Kuhn P., Poulev A., Rojo L. E., Lila M. A., Raskin I. 2012. In Vivo and In Vitro Antidiabetic Effects of Aqueous Cinnamon Extract and Cinnamon Polyphenol-Enhanced Food Matrix. *Food chemistry*, 135(4): 2994-3002.
- Chu C. J., Kemper K. J. 2001. Lavender (*Lavandula* spp.). Longwood Herbal Task Force, 32.
- Cohen P., Alessi D. R., Cross D. A. 1997. PDK1, One of The Missing Links In Insulin Signal Transduction? *FEBS letters*, 410(1): 3-10.
- Costa G., Francisco V., C Lopes M., T Cruz M., T Batista M. 2012. Intracellular Signaling Pathways Modulated by Phenolic Compounds: Application for New Anti-Inflammatory Drugs Discovery. *Current medicinal chemistry*, 19(18): 2876-2900.
- Çikladilmez Ş., 2013. Diyabet Tedavisinde Kullanılan Bitkiler ve Bitkisel Ürünler, Eczacılık Fakültesi, Erciyes Üniversitesi, Erciyes, Türkiye.
- Dadalioglu I., Evrendilek G. A. 2004. Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum Minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus Nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula Stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum Vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26): 8255-8260.
- DeFronzo R., 1997. Insulin Resistance: A Multifaceted Syndrome Responsible For NIDDM, Obesity, Hypertension, Dyslipidaemia and Atherosclerosis. *The Netherlands Journal of Medicine*, 50(5): 191-197.
- DeFronzo R. A., 2004. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Medical Clinics*, 88(4): 787-835.
- DeFronzo R. A., 2009. From The Triumvirate to The Ominous Octet: A New Paradigm for The Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*, 58(4): 773-795.
- DeFronzo R. A., Jacot E., Jequier E., Maeder E., Wahren J., & Felber J. P. 1981. The Effect of Insulin on the Disposal of Intravenous Glucose: Results from Indirect Calorimetry and Hepatic and Femoral Venous Catheterization. *Diabetes*, 30(12): 1000-1007.

- Delarue J., Magnan C. 2007. Free Fatty Acids and Insulin Resistance. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 10(2): 142-148.
- Dequ Z., Kang L., Jiali Y., Baolin L., Gaolin L. 2011. Luteolin Inhibits Inflammatory Response and Improves Insulin Sensitivity in the Endothelium. *Biochimie*, 93(3): 506-512.
- Desvergne B., Michalik L., Wahli W. 2006. Transcriptional Regulation of Metabolism. *Physiological Reviews*, 86(2): 465-514.
- Dresner A., Laurent D., Marcucci M., Griffin M. E., Dufour S., Cline G. W., Slezak L. A., Andersen D. K., Hundal R. S., Rothman D. L. 1999. Effects of Free Fatty Acids on Glucose Transport and IRS-1-Associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity. *Journal of Clinical Investigation*, 103(2): 253.
- Edgerton D. S., Lautz M., Scott M., Everett C. A., Stettler K. M., Neal D. W., Chu C. A., Cherrington A. D. 2006. Insulin's Direct Effects on the Liver Dominate The Control of Hepatic Glucose Production. *Journal of Clinical Investigation*, 116(2): 521.
- Enas E. A., Mohan V., Deepa M., Farooq S., Pazhoor S., & Chennikkara H. 2007. The Metabolic Syndrome and Dyslipidemia Among Asian Indians: A Population With High Rates of Diabetes and Premature Coronary Artery Disease. *Journal of the cardiometabolic syndrome*, 2(4): 267-275.
- Erdmann E., Charbonnel B., & Wilcox R. 2009. Thiazolidinediones and Cardiovascular Risk A Question Of Balance. *Current Cardiology Reviews*, 5(3): 155-165.
- Ertuğ F., 2002. Bodrum Yöresinde Halk Tibbinda Yararlanılan Bitkiler, Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir.
- Farag M., Ezzat S., Salama M., & Tadros M. 2016. Anti-Acetylcholinesterase Potential and Metabolome Classification of 4 Ocimum Species as Determined via UPLC/Qtof/MS and Chemometric Tools. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 125: 292-302.
- Felber J., Golay A. 2002. Pathways from Obesity to Diabetes. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders*, 26.

- Feldeisen S. E., Tucker K. L. 2007. Nutritional Strategies in The Prevention and Treatment of Metabolic Syndrome. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 32(1): 46-60.
- Fonseca V. A., 2008. *Metabolic Syndrome: Clinical publishing*.
- Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I. 2017. Increased Oxidative Stress in Obesity and Its Impact On Metabolic Syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(12): 1752-1761.
- Gamez M. J., Jimenez J., Risco S., Zarzuelo A. 1987. Hypoglycemic Activity in Various Species of The Genus *Lavandula*. Part 1: *Lavandula stoechas* L. And *Lavandula multifida* L. *Pharmazie*, 42(10): 706-707.
- Gerich J. E., Meyer C., Woerle H. J., Stumvoll M. 2001. Renal Gluconeogenesis. *Diabetes care*, 24(2): 382-391.
- Ginsberg H. N., 1991. Lipoprotein Physiology in Nondiabetic and Diabetic States: Relationship to Atherogenesis. *Diabetes care*, 14(9): 839-855.
- Ginsberg H. N., 2000. Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. *Journal of Clinical Investigation*, 106(4): 453.
- Ginsberg H. N., Zhang Y.-L., Hernandez-Ono A. 2005. Regulation of Plasma Triglycerides in Insulin Resistance and Diabetes. *Archives of Medical Research*, 36(3): 232-240.
- Goren A., Topcu G., Bilsel G., Bilsel M., Aydogmus Z., Pezzuto J. M. 2002. The Chemical Constituents and Biological Activity of Essential Oil of *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*. *Z Naturforsch C*, 57(9-10): 797-800.
- Govindaraj J., Pillai S. S. 2015. Rosmarinic Acid Modulates the Antioxidant Status and Protects Pancreatic Tissues from Glucolipotoxicity Mediated Oxidative Stress in High-Fat Diet: Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 404(1-2): 143-159.
- Govorko D., Logendra S., Wang Y., Esposito D., Komarnytsky S., Ribnicky D., Poulev A., Wang Z., Cefalu W. T., Raskin I. 2007. Polyphenolic Compounds from *Artemisia*

- dracunculus L. Inhibit PEPCK Gene Expression and Gluconeogenesis in an H4IIE Hepatoma Cell Line. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(6): E1503-E1510.
- Graf B. L., Raskin I., Cefalu W. T., Ribnicky D. M. 2010. Plant-Derived Therapeutics for the Treatment of Metabolic Syndrome. *Current Opinion in Investigational Drugs* London, England: 2000, 11(10): 1107.
- Grasman J., Callender H. L., Mensink M. 2017. Proportional Insulin Infusion in Closed-Loop Control of Blood Glucose. *PLoS ONE*, 12(1): e0169135.
- Griffin M. E., Marcucci M. J., Cline G. W., Bell K., Barucci N., Lee D., Goodyear L. J., Kraegen E. W., White M. F., & Shulman G. I. 1999. Free Fatty Acid-Induced Insulin Resistance is Associated with Activation of Protein Kinase C Theta And Alterations in The Insulin Signaling Cascade. *Diabetes*, 48(6): 1270-1274.
- Grundy S. M., 2008. Metabolic Syndrome Pandemic. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(4): 629-636.
- Grundy S. M., Cleeman J. I., Daniels S. R., Donato K. A., Eckel R. H., Franklin B. A., Gordon D. J., Krauss R. M., Savage P. J., & Smith S. C. 2005. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. *Circulation*, 112(17): 2735-2752.
- Guo L., Zhang L., Sun Y., Muskhelishvili L., Blann E., Dial S., Shi L., Schroth G., Dragan Y. P. 2006. Differences In Hepatotoxicity and Gene Expression Profiles by Anti-Diabetic PPAR γ Agonists on Rat Primary Hepatocytes and Human HEPG2 Cells. *Molecular Diversity*, 10(3): 349-360.
- Haddad P. S., Musallam L., Martineau L. C., Harris C., Lavoie L., Arnason J. T., Foster B., Bennett S., Johns T., Cuerrier A. 2012. Comprehensive Evidence-Based Assessment and Prioritization of Potential Antidiabetic Medicinal Plants: A Case Study from Canadian Eastern James Bay Cree Traditional Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Haffner S. M., Valdez R. A., Hazuda H. P., Mitchell B. D., Morales P. A., Stern M. P. 1992. Prospective Analysis of the Insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes*, 41(6): 715-722.
- Hall R. K., Granner D. K. 1999. Insulin Regulates Expression of Metabolic Genes Through

- Divergent Signaling Pathways. *Journal of Basic And Clinical Physiology and Pharmacology*, 10(2): 119-134.
- Hotamisligil G., 2008. Inflammation and Endoplasmic Reticulum Stress in Obesity and Diabetes. *International Journal of Obesity*, 32: S52-S54.
- Huang P. L., 2005. Unraveling the Links Between Diabetes, Obesity, and Cardiovascular Disease: *Am Heart Assoc.*
- Huang P. L., 2009. A Comprehensive Definition for Metabolic Syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, 2(5-6): 231-237.
- Isomaa B., Almgren P., Tuomi T., Forsén B., Lahti K., Nissén M., Taskinen M.-R., & Groop L. 2001. Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated with the Metabolic Syndrome. *Diabetes care*, 24(4): 683-689.
- İpek H., 2016. Makrofaj Hücrelerinde Karabaş Otu (*Lavandula Stoechas*) Özüt ve İkincil Metabolitlerinin Anti-İnflamatuar Etkisinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale, Türkiye.
- Jayanthi G., Subramanian S., 2015. RA Abrogates Hepatic Gluconeogenesis and Insulin Resistance by Enhancing IRS-1 and AMPK Signalling in Experimental Type 2 Diabetes. *RSC Advances*, 5(55): 44053-44067.
- Jialal I., Huet B. A., Kaur H., Chien A., Devaraj S. 2012. Increased Toll-Like Receptor Activity in Patients with Metabolic Syndrome. *Diabetes Care*, 35(4): 900-904.
- Jun M. S., Ha Y. M., Kim H. S., Jang H. J., Kim Y. M., Lee Y. S., Kim H. J., Seo H. G., Lee J. H., Lee S. H., Chang K. C. 2011. Anti-Inflammatory Action of Methanol Extract of *Carthamus Tinctorius* Involves in Heme Oxygenase-1 Induction. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2): 524-530.
- Jung U. J., Cho Y.-Y., Choi M.-S., 2016. Apigenin Ameliorates Dyslipidemia, Hepatic Steatosis and Insulin Resistance by Modulating Metabolic and Transcriptional Profiles in The Liver of High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*, 8(5): 305.
- Jung U. J., Lee M.-K., Park Y. B., Jeon S.-M., Choi M.-S. 2006. Antihyperglycemic and Antioxidant Properties of Caffeic Acid in Db/Db Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(2): 476-483.

- Kassi E., Chrousos G., Kaltsas G., & Pervanidou P. 2011. Metabolic Syndrome: Definitions and Controversies. *BMC Medicine*, 9(1): 48.
- Kaur J., 2014. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice*, 2014.
- Kim J.A., Montagnani M., Koh K. K., Quon M. J. 2006. Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction. *Circulation*, 113(15): 1888-1904.
- Kim S. H., Hyun S. H., Choung S. Y. 2006. Anti-Diabetic Effect of Cinnamon Extract on Blood Glucose in Db/Db Mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1): 119-123.
- Kong W., Wei J., Abidi P., Lin M., Inaba S., Li C., Wang Y., Wang Z., Si S., Pan H. 2004. Berberine is A Novel Cholesterol-Lowering Drug Working Through A Unique Mechanism Distinct from Statins. *Nature Medicine*, 10(12): 1344-1351.
- Kowalska K., Olejnik A., Rychlik J., Grajek W. 2014. Cranberries (*Oxycoccus quadripetalus*) Inhibit Adipogenesis and Lipogenesis in 3T3-L1 Cells. *Food Chemistry*, 148: 246-252.
- Kozan O., Oguz A., Abaci A., Erol C., Ongen Z., Temizhan A., Celik S. 2007. Prevalence of the Metabolic Syndrome Among Turkish Adults. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(4): 548-553.
- Kumar M., Nath S., Prasad H. K., Sharma G., Li Y. 2012. Micornas: A New Ray of Hope for Diabetes Mellitus. *Protein & Cell*, 3(10): 726-738.
- Kunnumakkara A. B., Bordoloi D., Padmavathi G., Monisha J., Roy N. K., Prasad S., & Aggarwal B. B. 2017. Curcumin, the Golden Nutraceutical: Multitargeting for Multiple Chronic Diseases. *British Journal of Pharmacology*, 174(11): 1325-1348.
- Kwon E.Y., Jung U. J., Park T., Yun J. W., Choi M.-S. 2014. Luteolin Attenuates Hepatic Steatosis and Insulin Resistance Through the Interplay Between the Liver and Adipose Tissue in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes*: DB_140631.
- Kyhse-Andersen J., 1984. Electroblothing of Multiple Gels: A Simple Apparatus without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins From Polycrylamide to Nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 10(3-4): 203-209.

- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *nature*, 227(5259): 680-685.
- Lakka H.M., Laaksonen D. E., Lakka T. A., Niskanen L. K., Kumpusalo E., Tuomilehto J., Salonen J. T. 2002. The Metabolic Syndrome and Total and Cardiovascular Disease Mortality in Middle-Aged Men. *Jama*, 288(21): 2709-2716.
- Lam D. W., LeRoith D. 2015. Metabolic syndrome.
- Lam T. K., Carpentier A., Lewis G. F., van de Werve G., Fantus I. G., & Giacca A. 2003. Mechanisms of the Free Fatty Acid-Induced Increase in Hepatic Glucose Production. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 284(5): E863-E873.
- Langin D., 2006. Adipose Tissue Lipolysis as a Metabolic Pathway to Define Pharmacological Strategies Against Obesity and the Metabolic Syndrome. *Pharmacological Research*, 53(6): 482-491.
- Leclercq I. A., Morais A. D. S., Schroyen B., Van Hul N., Geerts A. 2007. Insulin Resistance in Hepatocytes and Sinusoidal Liver Cells: Mechanisms and Consequences. *Journal of Hepatology*, 47(1): 142-156.
- Lee C. M. Y., Huxley R. R., Woodward M., Zimmet P., Shaw J., Cho N. H., Kim H. R., Viali S., Tominaga M., Vistisen D. 2008. Comparisons of Metabolic Syndrome Definitions in Four Populations of the Asia-Pacific Region. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 6(1): 37-46.
- Lender D., Sysko S. K. 2006. The Metabolic Syndrome and Cardiometabolic Risk: Scope of the Problem and Current Standard of Care. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 26(5P2).
- Leporatti M. L., Ghedira K. 2009. Comparative Analysis of Medicinal Plants Used in Traditional Medicine in Italy and Tunisia. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 5: 31.
- Lim E. L., 2012. Unravelling the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Doktora tezi*. Newcastle Üniversitesi, Avustralya.

- Liu Y., Wang M.-W. 2008. Botanical Drugs: Challenges and Opportunities: Contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. *Life Sciences*, 82(9): 445-449.
- Lumeng C. N., Saltiel A. R. 2011. Inflammatory Links Between Obesity and Metabolic Disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(6): 2111.
- Mancini A. D., Poitout V., 2013. The Fatty Acid Receptor FFA1/GPR40 a Decade Later: How Much Do We Know? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(8): 398-407.
- Marieb E., Hoehn K. Ninth Edition. 2013. *Human Anatomy and Physiology: The Pearson--Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. San Francisco, California.*
- Martínez-Abundis E., Mendez-del Villar M., Pérez-Rubio K. G., Zuñiga L. Y., Cortez-Navarrete M., Ramírez-Rodríguez A., González-Ortiz M. 2016. Novel Nutraceutical Therapies for the Treatment of Metabolic Syndrome. *World Journal of Diabetes*, 7(7): 142.
- Martins A. R., Silveira L. R., Vinolo M. A., Cury-Boaventura M. F., Lambertucci R. H., Gorjao R., Nachbar R. T., Curi R., Hirabara S. M., Festuccia W. T. 2012. Mechanisms Underlying Skeletal Muscle Insulin Resistance Induced by Fatty Acids: Importance of the Mitochondrial Function. *Lipids in Health and Disease*, 11(1): 30.
- Marvasti T. B., Adeli K. 2010. Pharmacological Management of Metabolic Syndrome and Its Lipid Complications. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(3): 146.
- Messaoud C., Chograni H., & Boussaid M. 2012. Chemical Composition and Antioxidant Activities of Essential Oils and Methanol Extracts of Three Wild Lavandula L. species. *Nat Prod Res*, 26(21): 1976-1984.
- Michael L. F., Wu Z., Cheatham R. B., Puigserver P., Adelmant G., Lehman J. J., Kelly D. P., Spiegelman B. M. 2001. Restoration of Insulin-Sensitive Glucose Transporter (GLUT4) Gene Expression In Muscle Cells by The Transcriptional Coactivator PGC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(7): 3820-3825.
- Miranda P. J., DeFronzo R. A., Califf R. M., Guyton J. R. 2005. Metabolic Syndrome: Definition, Pathophysiology, and Mechanisms. *American Heart Journal*, 149(1): 33-45.

- Mosmann T., 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55-63.
- Nammi S., Sreemantula S., Roufogalis B. D. 2009. Protective Effects of Ethanolic Extract of *Zingiber officinale* Rhizome on the Development of Metabolic Syndrome in High-Fat Diet-Fed Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 104(5): 366-373.
- Newman D. J., Cragg G. M. 2016. Natural Products as Sources of New Drugs From 1981 To 2014. *J. Nat. Prod.* 79(3): 629-661.
- Newman D. J., Cragg G. M., & Snader K. M. 2003. Natural Products as Sources of New Drugs Over The Period 1981– 2002. *Journal of Natural Products*, 66(7): 1022-1037.
- Norberg M., 2006. Identifying Risk of Type 2 Diabetes: Epidemiologic Perspectives from Biomarkers to Lifestyle. Doktora Tezi. Umeå Üniversitesi, İsveç.
- O’Keefe J. H., Gheewala N. M., O’Keefe J. O. 2008. Dietary Strategies for Improving Post Prandial Glucose, Lipids, Inflammation, and Cardiovascular Health. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(3): 249-255.
- Onar S., 2006. Bandırma (A1 (A), Balıkesir) ve Çevresinin Etnobotaniği, Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale.
- Onat A., 2011. Metabolic Syndrome: Nature, Therapeutic Solutions and Options. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 12(12): 1887-1900.
- Orchard T. J., Temprosa M., Goldberg R., Haffner S., Ratner R., Marcovina S., & Fowler S. 2005. The Effect of Metformin and Intensive Lifestyle Intervention on the Metabolic Syndrome: The Diabetes Prevention Program Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine*, 142(8): 611-619.
- Orhan S., 2007. Karabaş Otu (*Lavandula stoechas L.*) Bitkisinin Farklı In Vitro Besin Ortamlarında Kültüre Alınması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Türkiye.
- Otani H., 2011. Oxidative Stress as Pathogenesis of Cardiovascular Risk Associated with Metabolic Syndrome. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7): 1911-1926.
- Öztürk B., Konyalıoğlu S., Kantarcı G., Çetinkol D. 2005. İzmir Yöresindeki Yabani *Lavandula Stoechas L.* Subsp. *Stoechas* Taksonundan Elde Edilen Uçucu Yağın

- Bileşimi, Antibakteriyel, Antifungal Ve Antioksidan Kapasitesi. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 15(1).
- Pandit K., Goswami S., Ghosh S., Mukhopadhyay P., Chowdhury S. 2012. Metabolic Syndrome in South Asians. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16(1): 44.
- Paolisso G., Giugliano D., Pizza G., Gambardella A., Tesauro P., Varricchio M., & D'Onofrio F. 1992. Glutathione Infusion Potentiates Glucose-Induced Insulin Secretion in Aged Patients with Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Care*, 15(1): 1-7.
- Pareek H., Sharma S., Khajja B. S., Jain K., Jain G. 2009. Evaluation of Hypoglycemic and Anti-Hyperglycemic Potential of *Tridax procumbens* (Linn.). *BMC Complementary and Alternative medicine*, 9(1): 48.
- Pattnaik S., Subramanyam V. R., Bapaji M., Kole C. R. 1997. Antibacterial and Antifungal Activity of Aromatic Constituents of Essential Oils. *Microbios*, 89(358): 39-46.
- Petersen K. F., Shulman G. I. 2002. Pathogenesis of Skeletal Muscle Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. *The American journal of cardiology*, 90(5): 11-18.
- Pilkis S. J., Granner D. 1992. Molecular Physiology of the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. *Annual Review of Physiology*, 54(1): 885-909.
- Pinet M., Castell A., Baiges I., Montagut G., Arola L., Ardévol A. 2008. Bioactivity of Flavonoids on Insulin-Secreting Cells. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(4): 299-308.
- Porte Jr D., 2001. Clinical Importance of Insulin Secretion and Its Interaction with Insulin Resistance in The Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus and Its Complications. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 17(3): 181-188.
- Preuss H. G., Echard B., Polansky M. M., Anderson R. 2006. Whole Cinnamon and Aqueous Extracts Ameliorate Sucrose-Induced Blood Pressure Elevations in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2): 144-150.

- Quesada H., Del Bas J., Pajuelo D., Diaz S., Fernandez-Larrea J., Pinent M., Arola L., Salvadó M., Bladé C. 2009. Grape Seed Proanthocyanidins Correct Dyslipidemia Associated with A High-Fat Diet in Rats and Repress Genes Controlling Lipogenesis And VLDL Assembling in Liver. *International Journal of Obesity*, 33(9): 1007-1012.
- Quinn P., Yeagley D. 2005. Insulin Regulation of PEPCCK Gene Expression: A Model for Rapid and Reversible Modulation. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 5(4): 423-437.
- Ragheb R., Medhat A. 2011. Mechanisms of Fatty Acid-Induced Insulin Resistance In Muscle and Liver. *J Diabetes Metab*, 2(127): 1-6.
- Ragheb R., Medhat A. M., Shanab G. M., Seoudi D. M., Fantus I. 2008. Links between Enhanced Fatty Acid Flux, Protein Kinase C and NFκB Activation, and apoB-Lipoprotein Production in the Fructose-Fed Hamster Model of Insulin Resistance. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 370(1): 134-139.
- Rayalam S., Della-Fera M. A., Baile C. A. 2008. Phytochemicals and Regulation of the Adipocyte Life Cycle. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(11): 717-726.
- Ribnicky D., Poulev A., Watford M., Cefalu W., Raskin I. 2006. Antihyperglycemic Activity Of Tarralin™, An Ethanolic Extract of *Artemisia dracunculus* L. *Phytomedicine*, 13(8): 550-557.
- Richelsen B., Tonstad S., Rössner S., Toubro S., Niskanen L., Madsbad S., Mustajoki P., Rissanen A. 2007. Effect of Orlistat on Weight Regain and Cardiovascular Risk Factors Following A Very-Low-Energy Diet in Abdominally Obese Patients. *Diabetes Care*, 30(1): 27-32.
- Rines A. K., Sharabi K., Tavares C. D., Puigserver P. 2016. Targeting Hepatic Glucose Metabolism in The Treatment of Type 2 Diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Rojo L. E., Ribnicky D., Logendra S., Poulev A., Rojas-Silva P., Kuhn P., Dorn R., Grace M. H., Lila M. A., Raskin I. 2012. In Vitro and In Vivo Anti-Diabetic Effects of Anthocyanins from Maqui Berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chemistry*, 131(2): 387-396.
- Rome S., Clément K., Rabasa-Lhoret R., Loizon E., Poitou C., Barsh G. S., Riou J.-P., Laville M., & Vidal H. 2003. Microarray Profiling of Human Skeletal Muscle

- Reveals That Insulin Regulates~ 800 Genes During An Hyperinsulinemic Clamp. *Journal of Biological Chemistry*.
- Ryu E. Y., Park A. J., Park S. Y., Park S. H., Eom H. W., Kim Y. H., Park G., & Lee S.-J. 2012. Inhibitory Effects of Ginkgo biloba Extract on Inflammatory Mediator Production by Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide in Murine Macrophages via Nrf-2 Mediated Heme Oxygenase-1 Signaling Pathways. *Inflammation*, 35(4): 1477-1486.
- Saltiel A. R., & Kahn C. R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865): 799-806.
- Sarıkan I., 2007. Kazdağları yöresinin geleneksel ilaçlarının saptanması. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Türkiye.
- Savage D. B., Petersen K. F., Shulman G. I. 2007. Disordered Lipid Metabolism and The Pathogenesis of Insulin Resistance. *Physiological reviews*, 87(2): 507-520.
- Scazzocchio B., Vari R., Filesi C., D'Archivio M., Santangelo C., Giovannini C., Iacovelli A., Silecchia G., Volti G. L., Galvano F. 2011. Cyanidin-3-O- β -glucoside and Protocatechuic Acid Exert Insulin-Like Effects by Upregulating PPAR γ Activity in Human Omental Adipocytes. *Diabetes*, 60(9): 2234-2244.
- Schinner S., Scherbaum W., Bornstein S., Barthel A. 2005. Molecular Mechanisms of Insulin resistance. *Diabetic Medicine*, 22(6): 674-682.
- Schmid B., Rippmann J. F., Tadayyon M., Hamilton B. S. 2005. Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(4): 1073-1082.
- Schmitz-Peiffer C., 2000. Signalling Aspects of Insulin Resistance in Skeletal Muscle: Mechanisms Induced by Lipid Oversupply. *Cellular signalling*, 12(9): 583-594.
- Sebai H., Jabri M.-A., Souli A., Hosni K., Rtibi K., Tebourbi O., El-Benna J., Sakly M. 2015. Chemical Composition, Antioxidant Properties and Hepatoprotective Effects of Chamomile (*Matricaria recutita* L.) Decoction Extract against Alcohol-Induced Oxidative Stress in Rat. *General Physiology and Biophysics*, 34(3): 263-275.

- Sebai H., Selmi S., Rtibi K., Souli A., Gharbi N., Sakly M. 2013. Lavender (*Lavandula stoechas* L.) Essential Oils Attenuate Hyperglycemia and Protect Against Oxidative Stress in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Lipids in health and disease*, 12(1): 189.
- Semenkovich C. F. 2006. Insulin Resistance and Atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 116(7): 1813.
- Semple R. K., Sleigh A., Murgatroyd P. R., Adams C. A., Bluck L., Jackson S., Vottero A., Kanabar D., Charlton-Menys V., Durrington P. 2009. Postreceptor Insulin Resistance Contributes to Human Dyslipidemia and Hepatic Steatosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(2): 315.
- Seppälä-Lindroos A., Vehkavaara S., Häkkinen A.M., Goto T., Westerbacka J., Sovijärvi A., Halavaara J., Yki-Järvinen H. 2002. Fat Accumulation in The Liver is Associated With Defects in Insulin Suppression of Glucose Production and Serum Free Fatty Acids Independent of Obesity in Normal Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(7): 3023-3028.
- Shibasaki M., Bujo H., Takahashi K., Murakami K., Unoki H., Saito Y. 2006. Catalytically Inactive Lipoprotein Lipase Overexpression Increases Insulin Sensitivity In Mice. *Hormone and Metabolic Research*, 38(08): 491-496.
- Shin J. A., Lee J. H., Lim S. Y., Ha H. S., Kwon H. S., Park Y. M., Lee W. C., Kang M. I., Yim H. W., Yoon K. H. 2013. Metabolic Syndrome as A Predictor of Type 2 Diabetes, and Its Clinical Interpretations and Usefulness. *Journal of Diabetes Investigation*, 4(4): 334-343.
- Singhal P., Caumo A., Carey P. E., Cobelli C., Taylor R. 2002. Regulation of Endogenous Glucose Production after A Mixed Meal in Type 2 Diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 283(2): E275-E283.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R. M. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Sivaprakasapillai B., Edirisinghe I., Randolph J., Steinberg F., Kappagoda T. 2009. Effect of Grape Seed Extract on Blood Pressure in Subjects with the Metabolic Syndrome. *Metabolism*, 58(12): 1743-1746.

- Skoula M., Abidi C., Kokkalou E. 1996. Essential Oil Variation of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* Growing Wild in Crete (Greece).
- Smith S. R., Weissman N. J., Anderson C. M., Sanchez M., Chuang E., Stubbe S., Bays H., Shanahan W. R., Modification B., Overweight L. f., Group O. M. S. 2010. Multicenter, Placebo-Controlled Trial of Lorcaserin For Weight Management. *New England Journal of Medicine*, 363(3): 245-256.
- Soares A., Guichardant M., Cozzone D., Bernoud-Hubac N., Bouzaidi-Tiali N., Lagarde M., Geloën A. 2005. Effects of Oxidative Stress on Adiponectin Secretion And Lactate Production In 3T3-L1 Adipocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(7): 882-889.
- Srinivasan K., 2006. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A Review of Health Beneficial Physiological Effects. *Food Reviews International*, 22(2): 203-224.
- Stears A., O’Rahilly S., Semple R. K., Savage D. B. 2012. Metabolic Insights from Extreme Human Insulin Resistance Phenotypes. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 26(2): 145-157.
- Stefkov G., Kulevanova S., Miova B., Dinevska-Kjovkarovska S., Mølgaard P., Jäger A. K., Josefsen K. 2011. Effects of *Teucrium polium* spp. *capitatum* Flavonoids on the Lipid and Carbohydrate Metabolism in Rats. *Pharmaceutical Biology*, 49(9): 885-892.
- Tabassum N., Ahmad F. 2011. Role of Natural Herbs in the Treatment of Hypertension. *Pharmacogn Rev*, 5(9): 30-40.
- Tahraoui A., El-Hilaly J., Israili Z. H., & Lyoussi B. 2007. Ethnopharmacological Survey of Plants Used in The Traditional Treatment of Hypertension and Diabetes In south-eastern Morocco (Errachidia province). *J Ethnopharmacol*, 110(1): 105-117.
- Taupin P., 2009. Apigenin and Related Compounds Stimulate Adult Neurogenesis: Mars, Inc., The Salk Institute for Biological Studies: WO2008147483. Expert opinion on therapeutic patents, 19(4): 523-527.
- Thomas G. N., Ho S.-Y., Janus E. D., Lam K. S., Hedley A. J., Lam T. H., Committee H. K. C. R. F. P. S. S. 2005. The US National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) Prevalence of The Metabolic Syndrome in A

- Chinese Population. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 67(3): 251-257.
- Tovey E. R., Baldo B. A. 1987. Comparison of Semi-Dry and Conventional Tank-Buffer Electrotransfer of Proteins From Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Membranes. *Electrophoresis*, 8(9): 384-387.
- Tsukumo D. M., Carvalho-Filho M. A., Carvalheira J. B., Prada P. O., Hirabara S. M., Schenka A. A., Araújo E. P., Vassallo J., Curi R., & Velloso L. A. 2007. Loss-of-Function Mutation in Toll-Like Receptor 4 Prevents Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*, 56(8): 1986-1998.
- Tuzlacı E., 2002. Datça Yarımadası (Muğla) Florası ve Bu Yörede Halkın Yararlandığı Bitkiler. KHC Başer ve N. Kırimer (Eds.) 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29-31 Mayıs 2002 Eskişehir: ISBN 975-94077-2-8.
- Tuzlaci E., Aymaz P. E. 2001. Turkish Folk Medicinal Plants, Part IV: Gonen (Balıkesir). *Fitoterapia*, 72(4): 323-343.
- Uchida T., Myers M. G., White M. F. 2000. IRS-4 Mediates Protein Kinase B Signaling During Insulin Stimulation without Promoting Antiapoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 20(1): 126-138.
- Ugulu I., Baslar S., Yorek N., Dogan Y. 2009. The Investigation and Quantitative Ethnobotanical Evaluation of Medicinal Plants Used Around Izmir Province, Turkey. *Journal of Medicinal plants research*, 3(5): 345-367.
- Unger R. H., 2003. Minireview: Weapons of Lean Body Mass Destruction: The Role of Ectopic Lipids in the Metabolic Syndrome. *Endocrinology*, 144(12): 5159-5165.
- Upton T. M., Grayer R. J., Greenham J. R., Williams C. A., Al-Ghamdi F., & Chen F.-H. 2000. Leaf Flavonoids as Systematic Characters in the Genera *Lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(10): 991-1007.
- Valentová K. I., Truong N. T., Moncion A., De Waziers I., Ulrichová J. 2007. Induction of Glucokinase Mrna by Dietary Phenolic Compounds in Rat Liver Cells In Vitro. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 55(19): 7726-7731.
- Vanita P., Jhansi K. 2011. Metabolic Syndrome in Endocrine System. *J Diabetes Metab*, 2(163): 2.

- Vinayagam R., Jayachandran M., Xu B. 2016. Antidiabetic Effects of Simple Phenolic Acids: A Comprehensive Review. *Phytotherapy Research*, 30(2): 184-199.
- Vinayagam R., Xu B. 2015. Antidiabetic Properties of Dietary Flavonoids: A Cellular Mechanism Review. *Nutrition & Metabolism*, 12(1): 60.
- Virkamäki A., Ueki K., Kahn C. R. 1999. Protein-Protein Interaction In Insulin Signaling and the Molecular Mechanisms Of Insulin Resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 103(7): 931.
- Wakabayashi N., Slocum S. L., Skoko J. J., Shin S., Kensler T. W. 2010. When NRF2 Talks, Who's Listening? *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(11): 1649-1663.
- Wang H., Reaves L. A., Edens N. K. 2006. Ginseng Extract Inhibits Lipolysis in Rat Adipocytes In Vitro by Activating Phosphodiesterase 4. *The Journal of Nutrition*, 136(2): 337-342.
- Wang L., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E.-M., Blunder M., Liu X., Malainer C., Blazevic T., Schwaiger S., Rollinger J. M., Heiss E. H. 2014. Natural Product Agonists of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR γ): A review. *Biochemical Pharmacology*, 92(1): 73-89.
- Wang Z. Q., Ribnicky D., Zhang X. H., Raskin I., Yu Y., & Cefalu W. T. 2008. Bioactives of *Artemisia dracunculoides* L. Enhance Cellular Insulin Signaling in Primary Human Skeletal Muscle Culture. *Metabolism*, 57: S58-S64.
- Watanabe C., 1918. Studies in the Metabolic Changes Induced by Administration of Guanidine Bases. II. The Influence of Guanidine upon Urinary Ammonia and Acid Secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, 34: 51.
- Waterman C., Cheng D. M., Rojas-Silva P., Poulev A., Dreifus J., Lila M. A., Raskin I. 2014. Stable, Water Extractable Isothiocyanates from *Moringa Oleifera* Leaves Attenuate Inflammation In Vitro. *Phytochemistry*, 103: 114-122.
- Waterman C., Rojas-Silva P., Tumer T. B., Kuhn P., Richard A. J., Wicks S., Stephens J. M., Wang Z., Mynatt R., Cefalu W. 2015. Isothiocyanate-Rich *Moringa Oleifera* Extract Reduces Weight Gain, Insulin Resistance, and Hepatic Gluconeogenesis In Mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(6): 1013-1024.

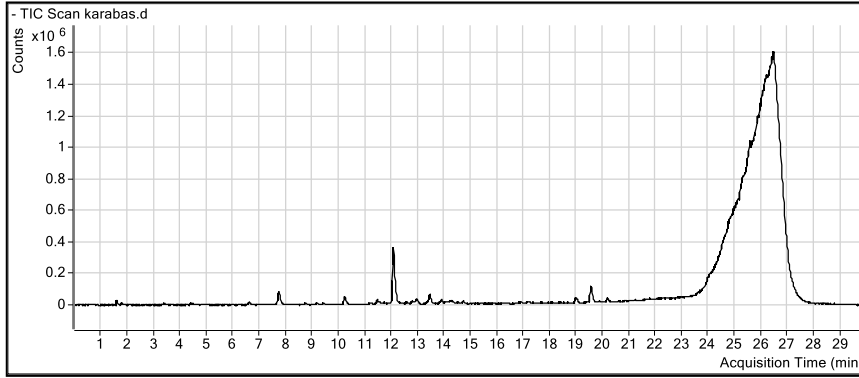
- Watson R. T., Kanzaki M., Pessin J. E. 2004. Regulated Membrane Trafficking of the Insulin-Responsive Glucose Transporter 4 In Adipocytes. *Endocrine Reviews*, 25(2): 177-204.
- Wellen K. E., Hotamisligil G. S. 2005. Inflammation, Stress, and Diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 115(5): 1111.
- Welty T. K., Lee E. T., Yeh J., Cowan L. D., Go O., Fabsitz R. R., Le N.-A., Oopik A. J., Robbins D. C., & Howard B. V. 1995. Cardiovascular Disease Risk Factors among American Indians: The Strong Heart Study. *American Journal of Epidemiology*, 142(3): 269-287.
- Whitney E., Rolfes S. R. 2007. *Understanding nutrition: Cengage Learning*.
- Wolfrum C., Besser D., Luca E., Stoffel M. 2003. Insulin Regulates The Activity of Forkhead Transcription Factor HNF-3B/FOXO-2 by Akt-Mediated Phosphorylation and Nuclear/Cytosolic Localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20): 11624-11629.
- Wolfrum S., Jensen K. S., & Liao J. K. 2003. Endothelium-Dependent Effects of Statins. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(5): 729-736.
- Xia X., Weng J. 2010. Targeting Metabolic Syndrome: Candidate Natural Agents. *Journal of Diabetes*, 2(4): 243-249.
- Xu H., 2013. Obesity and Metabolic inflammation. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 10(1): e21-e25.
- Yamaoka K., Tango T. 2012. Effects of Lifestyle Modification on Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC medicine*, 10(1): 138.
- Yenici N., 1999. *Lavandula stoechas* Bitkisinin Özellikleri ve Fibrinolitik Sisteme Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Türkiye.
- Yin J., Zhang H., Ye J. 2008. Traditional Chinese Medicine in Treatment of Metabolic Syndrome. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 8(2): 99-111.
- Yki-Järvinen H., 2005. Fat in the Liver and Insulin Resistance. *Annals of medicine*, 37(5): 347-356.

- Yu C., Chen Y., Cline G. W., Zhang D., Zong H., Wang Y., Bergeron R., Kim J. K., Cushman S. W., Cooney G. J. 2002. Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-Associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity In Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52): 50230-50236.
- Zhang T., He J., Xu C., Zu L., Jiang H., Pu S., Guo X., Xu G. 2009. Mechanisms of Metformin Inhibiting Lipolytic Response to Isoproterenol in Primary Rat Adipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*, 42(1): 57-66.
- Zhou L., Wang X., Shao L., Yang Y., Shang W., Yuan G., Jiang B., Li F., Tang J., Jing H. 2008. Berberine Acutely Inhibits Insulin Secretion from B-Cells Through 3', 5'-Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate Signaling Pathway. *Endocrinology*, 149(9): 4510-4518.
- Zhu F., Asada T., Sato A., Koi Y., Nishiwaki H., Tamura H. 2014. Rosmarinic Acid Extract for Antioxidant, Antiallergic, and alpha-Glucosidase Inhibitory Activities, Isolated by Supramolecular Technique and Solvent Extraction from Perilla Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4): 885-892.
- Zimmet P., Alberti K., Shaw J. 2001. Global and Societal Implications of the Diabetes Epidemic. *Nature*, 414(6865): 782-787.
- Zimmet P., Magliano D., Matsuzawa Y., Alberti G., & Shaw J. 2005. The Metabolic Syndrome: A Global Public Health Problem and A New Definition. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 12(6): 295-300.
- Zuzarte M., Gonçalves M. J., Cavaleiro C., Cruz M. T., Benzarti A., Marongiu B., Maxia A., Piras A., & Salgueiro L. 2013. Antifungal and Anti-Inflammatory Potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* Essential Oils. *Industrial Crops and Products*, 44: 97-103.

<https://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/Techniques/TechElectrophoresis.htm>



EK 1. EE'nin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Fenolik Profilinin Belirlenmesi,
Flash Kromatografisi Kromatogramları

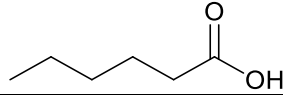
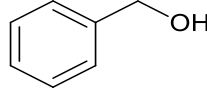


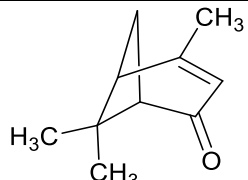
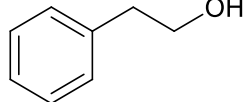
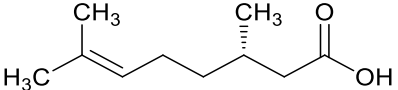
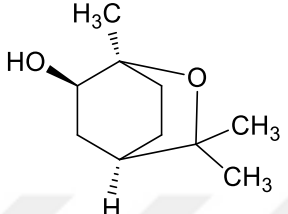
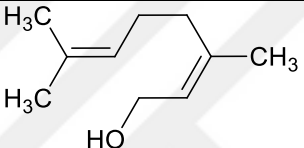
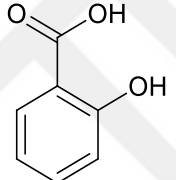
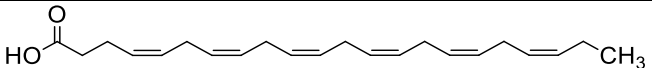
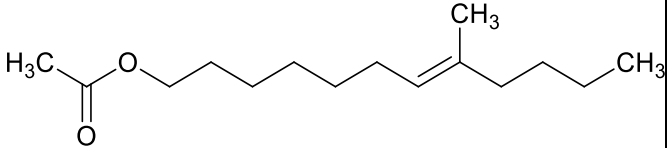
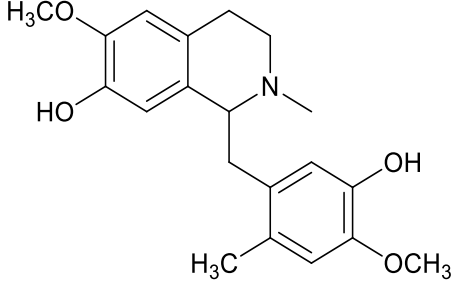
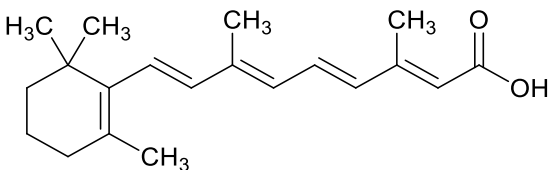
EK Şekil 1.1. EE'nin HPLC-TOF kromatogramı

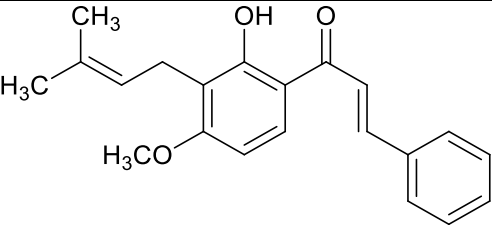
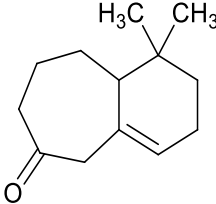
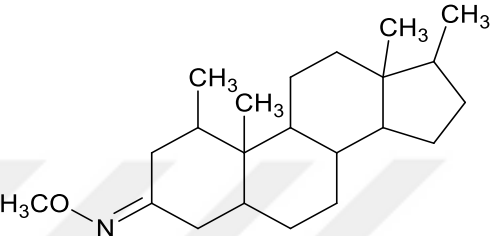
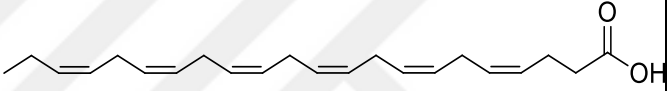
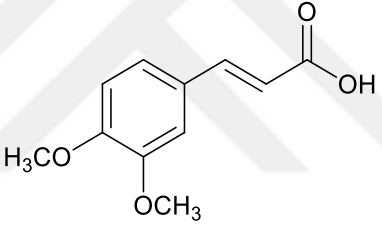
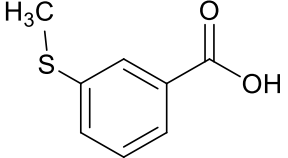
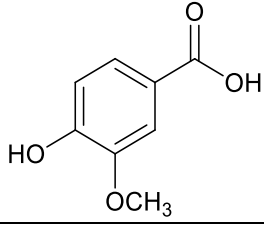
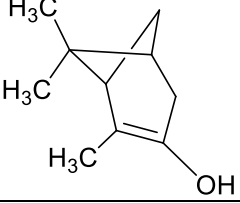
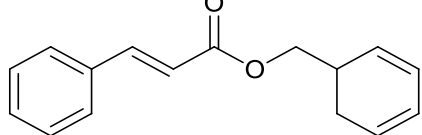
RT	Bileşenler	Konsantrasyon [ppb (ng/ml)]
4.40	Gentisik asit	130.6236
6.60	4-Hidroksibenzoik asit	501.0753
7.00	Protokateşuik asit	56.0319
7.71	Kafeik asit	453.6731
7.84	Vanilik asit	26.2536
9.18	4-Hidroksibenzaldehit	-
9.98	p-Kumarik asit	-
9.97	Sisorik asit	59.2144
10.81	Ferulik asit	73.9354
11.42	Apigenin-7-glukozit	165.8712
12.53	Hesperidin	-
13.19	Rosmarinik asit	1420.2112
13.96	Salisilik asit	39.1713
15.92	Sinamik asit	-

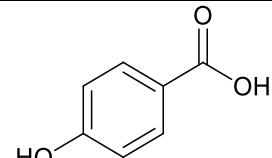
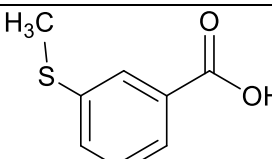
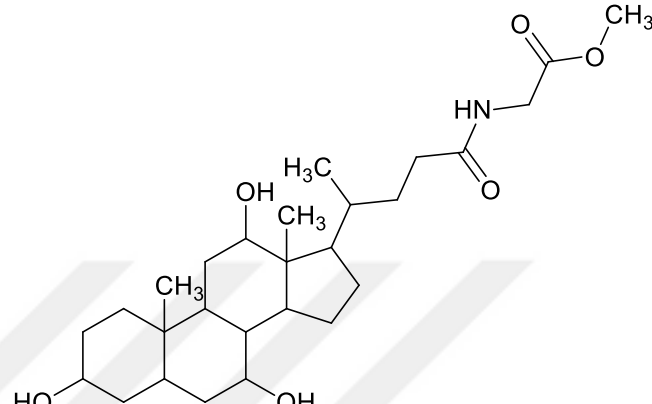
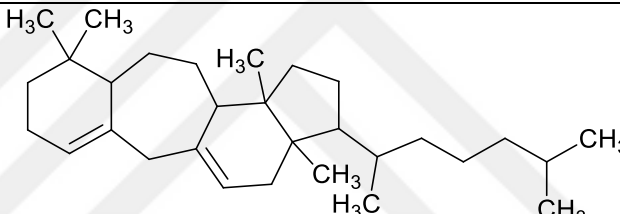
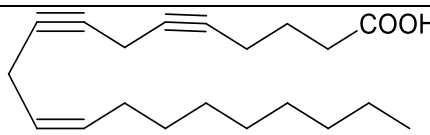
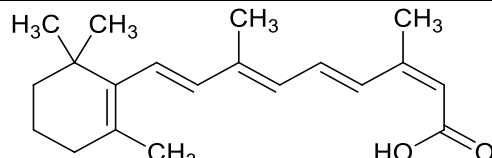
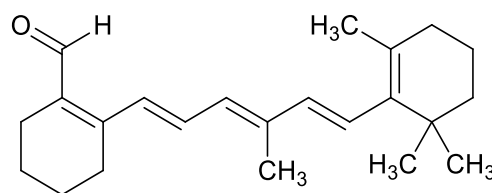
EK Şekil 1.2. EE'nin HPLC-TOF/MS Analiz Sonuçları

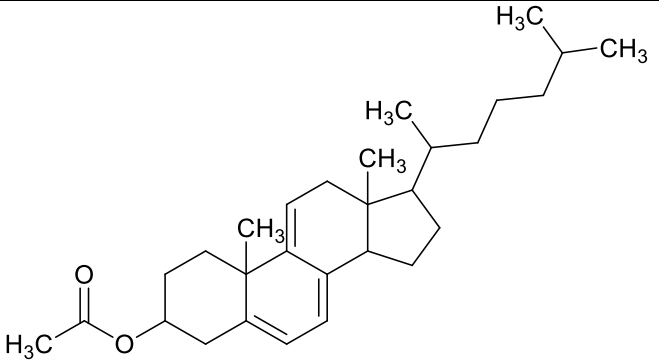
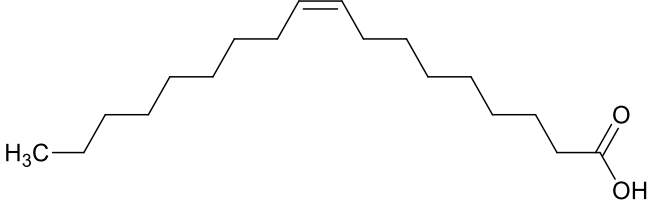
EK Çizelge 1.1. EE'nin GC-MS Analizi Sonuçları

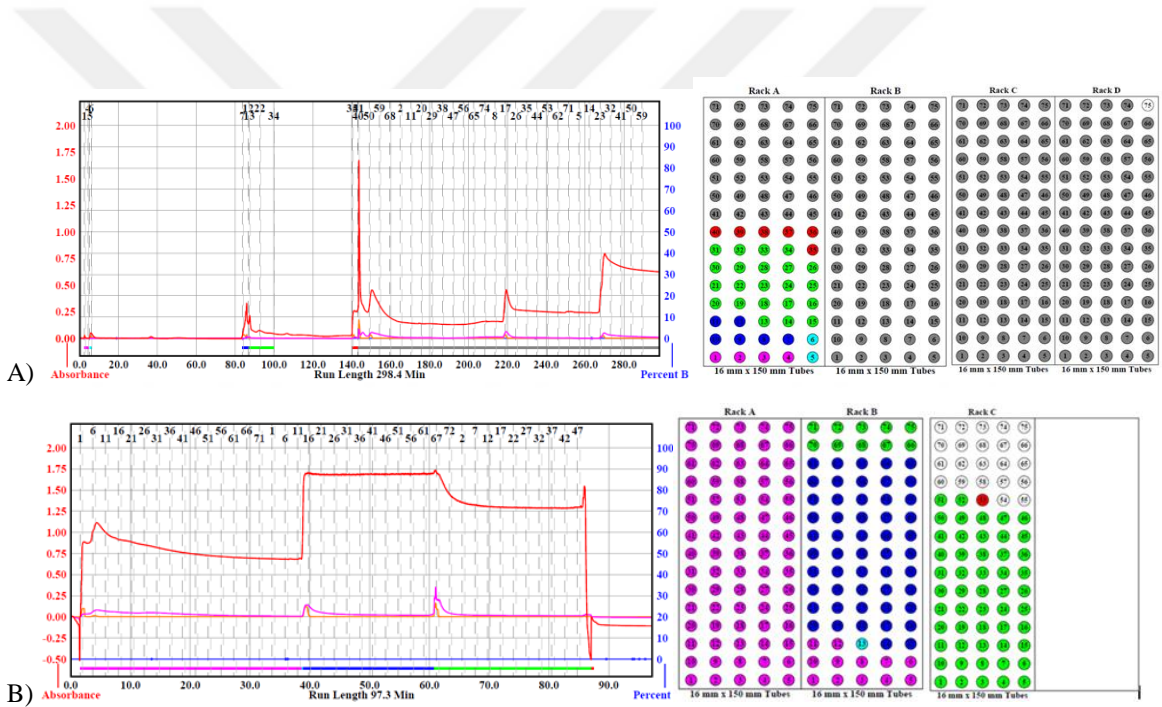
No	RT	Bileşik İsmi	Molekül şekli	Miktar (%)
1	8.96	Hexanoic acid		1,39
2	12.55	Benzyl alcohol		2,10

3	15.2 0	Verbenone		1,41
4	15.6 2	2-Phenylethanol		2,90
5	17.4 6	Citronellic acid		1,07
6	18.2 8	2-Hydroxycineol		1,02
7	19.5 6	Nerol		0,82
8	20.1 0	Salicylic acid		1,14
9	20.6 2	Docosahexaenoic acid		1,16
10	21.0 3	8-Methyl-7-dodecen-1-ol acetate		1,95
11	21.5 8	Reticuline, 6'methyl		18,27
12	21.9 4	Myrtenoic acid		1,54

13	22.6 1	Derricin		4,37
14	22.9 7	1,1-Dimethyl-1,2,3,5,7,8,9,9a-octahydro-benzocyclohepten-6-one		1,90
15	23.4 7	Androstan-3-one, 17dimethyl-17 [(trimethylsilyl)oxy]-O-methylxime		0,61
16	23.6 5	4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid, trimethylsilyl ester		1,95
17	24.7 3	3,4-Dimethoxycinnamic acid		1,73
18	25.2 5	(6,6-dimethyl-4 bicyclo[3.1.1]heptanyl)methoxy trimethylsilane		1,08
19	26.3 1	Vanillic acid		0,67
20	26.4 3	Pinene, 3-trimethylsilyloxy-		0,64
21	26.7 7	Benzyl cinnamate		0,66

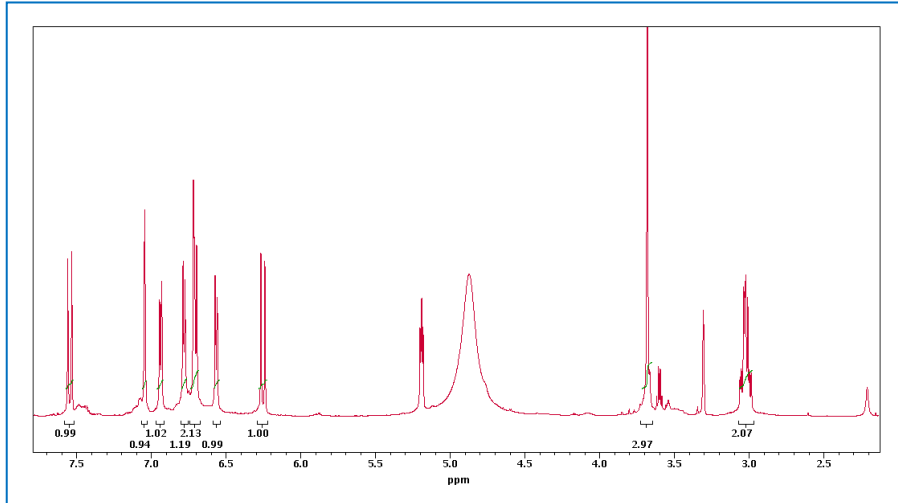
22	27.78	4-Hydroxybenzoic acid		5,30
23	28.24	3-(Methylthio)benzoic acid		1,11
24	31.68	Glycine, N-[(3 α ,5 β ,7 α ,12 α)-24-oxo-3,7,12 tris[(trimethylsilyl)oxy]cholan-24-yl]-, methyl		2,88
25	33.92	1(10),9(11)-B-Homolanistadiene		2,14
26	34.86	5,8,11-Eicosatriynoic acid		0,85
27	35.28	13-cis-Retinoic acid, trimethylsilyl ester		2,80
28	39.10	2-[4-methyl-6-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)hexa-1,3,5-trienyl]cyclohex-1-en-1-carboxaldehyde		1,01

29	48.9 8	Cholesta-5,7,9(11)- trien-3-ol acetate		2,78
30	51.3 0	Oleic acid		4,46

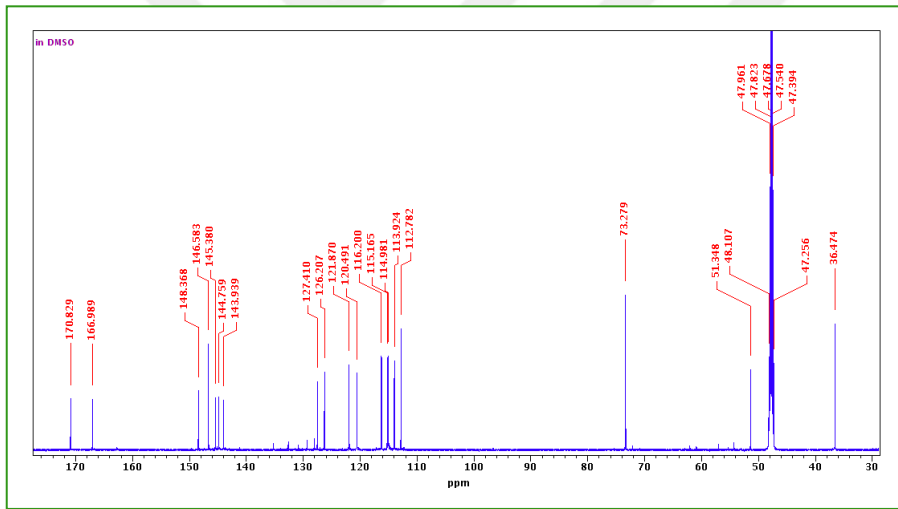


EK Şekil 1.3. A) Flash Kromatografi 1. Program'da elde edilen kromatogramlar ve benzer fraksiyonlar, B) Flash Kromatografi 2. Program'da elde edilen kromatogramlar ve benzer fraksiyonlar

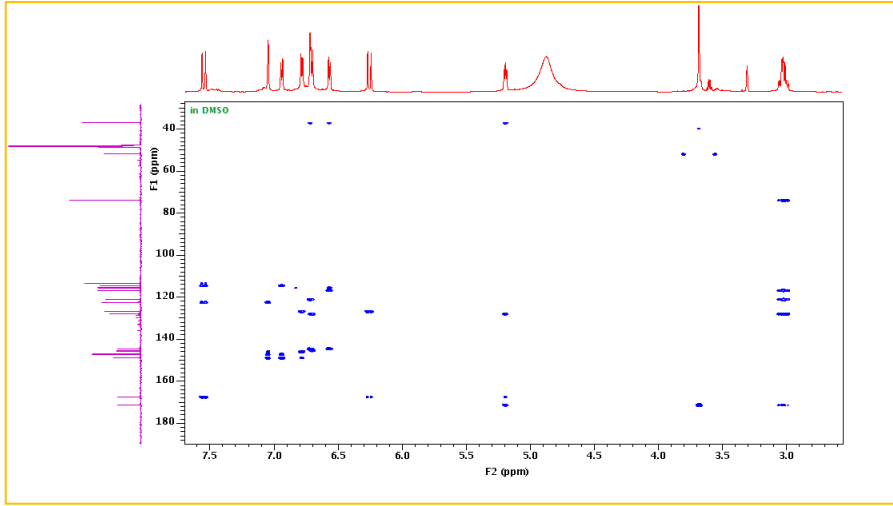
EK 2. EE aktif fraksiyonlarından saflaştırılan moleküllere ait NMR spektrumları



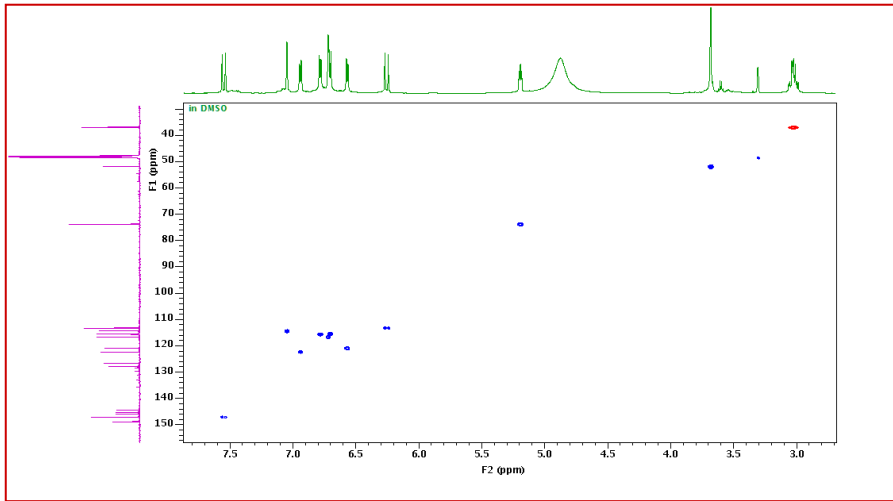
a) E8-1 bileşiminin ^1H (Proton) NMR spektrumu



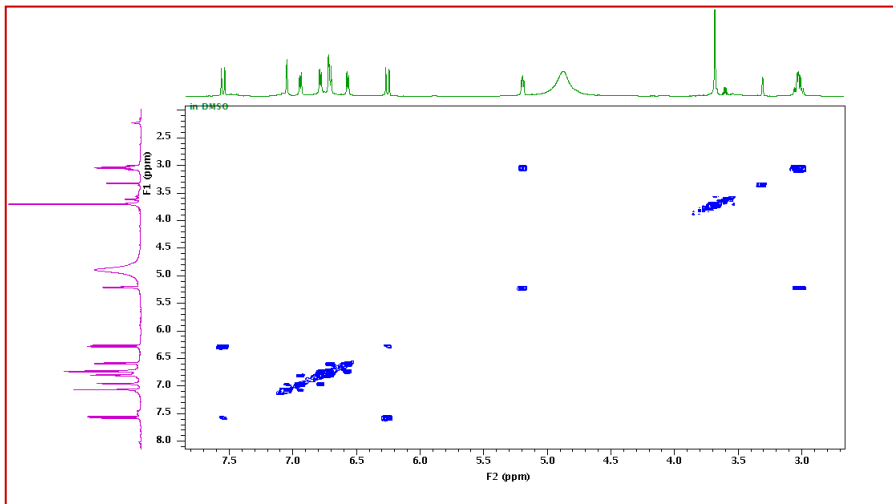
b) E8-1 bileşiminin ^{13}C (Karbon) NMR spektrumu



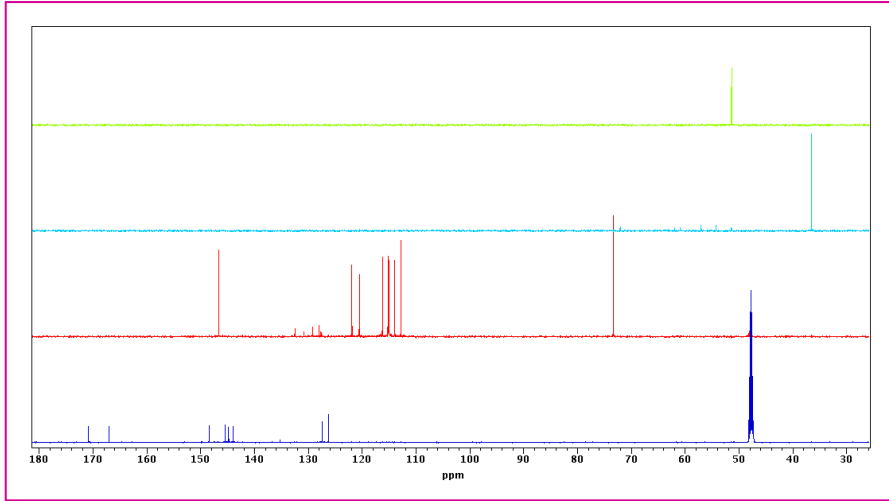
c) E8-1 bileşğinin HMBC NMR spektrumu



d) E8-1 bileşğinin HSQC NMR spektrumu

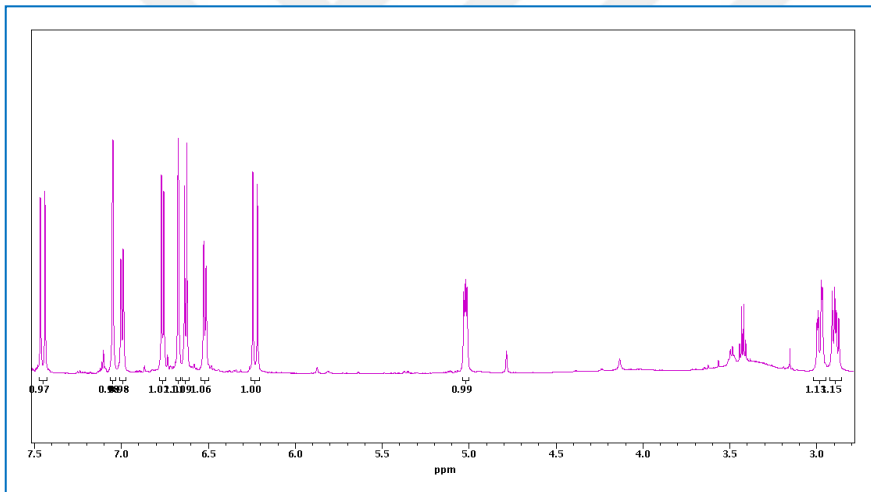


e) E8-1 bileşğinin COSY NMR spektrumu

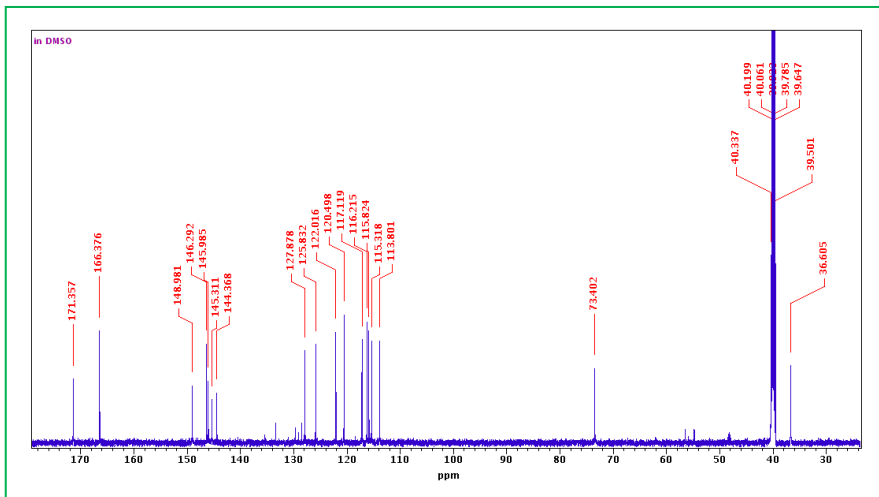


f) E8-1 bileşinin DEPT NMR spektrumu

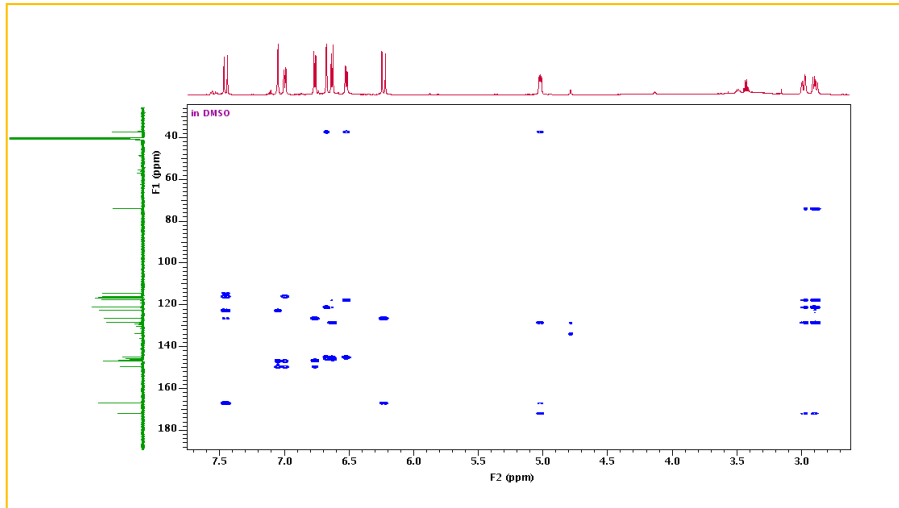
EK Şekil 2.1. E8 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E8-1 bileşiğine ait a) ^1H (Proton), b) (Karbon), c) HMBC, d) HSQC, e) COSY, f) DEPT NMR analizi sonuçları



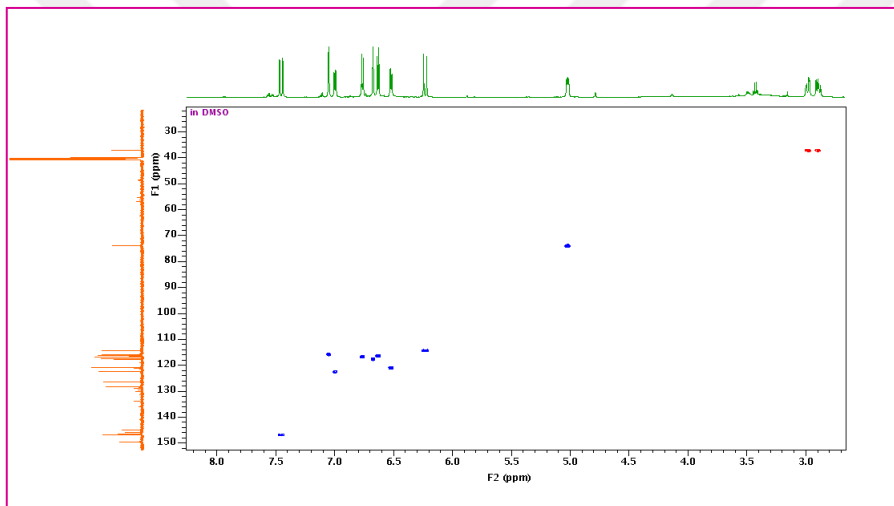
a) E8-2 bileşinin ^1H (Proton) NMR spektrumu



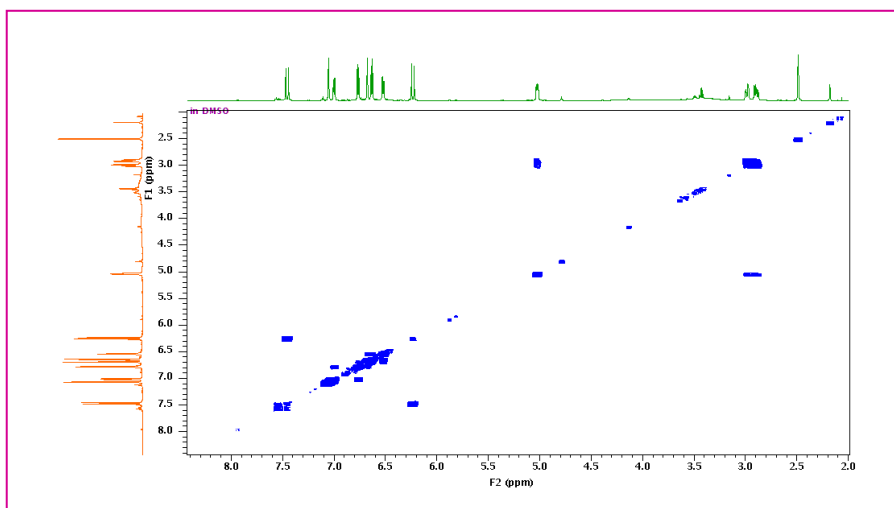
b) E8-2 bileşinin ^{13}C (Karbon) NMR spektrumu



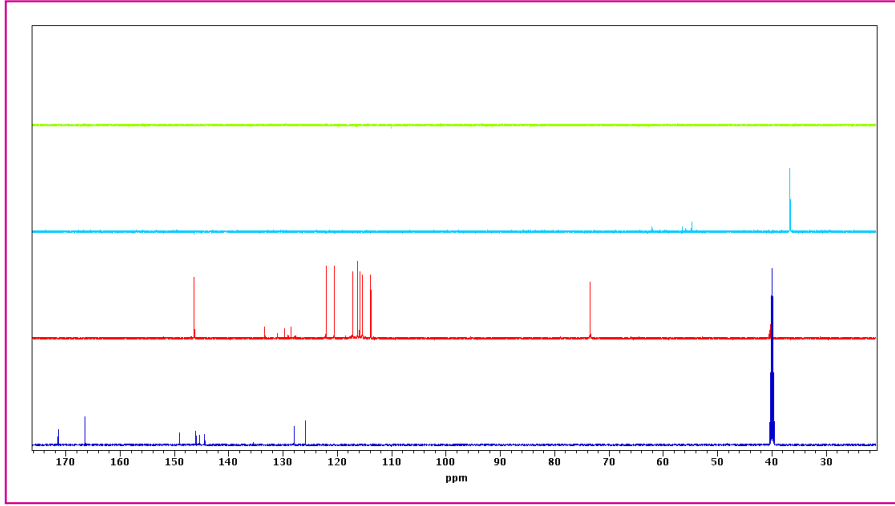
c) E8-2 bileşiginin HMBC NMR spektrumu



d) E8-2 bileşiginin HSQC NMR spektrumu

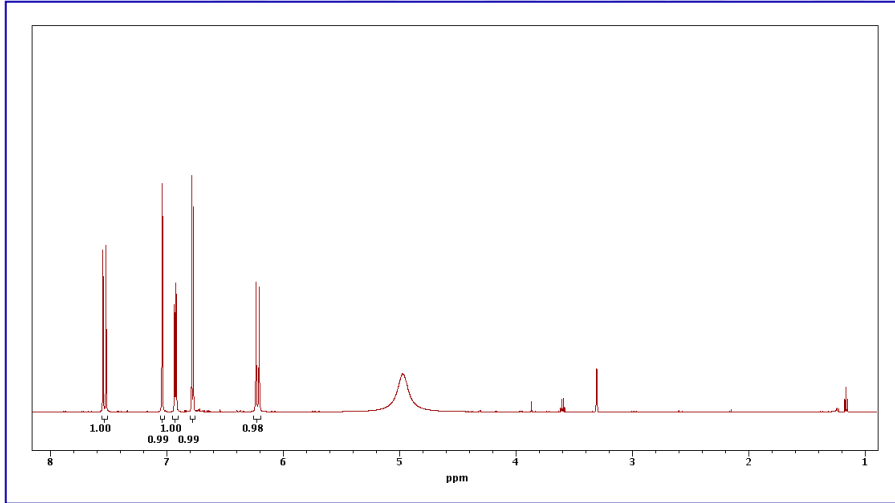


e) E8-2 bileşiginin COSY NMR spektrumu

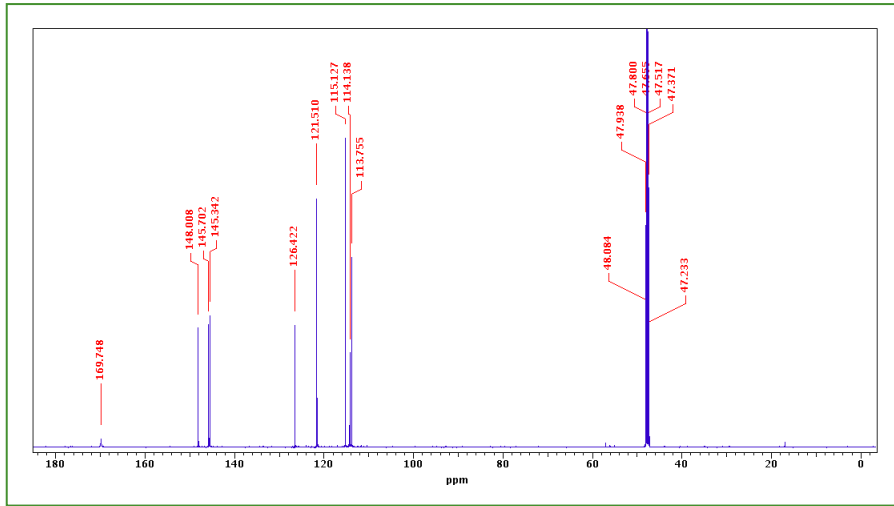


f) E8-2 bileşığının DEPT NMR spektrumu

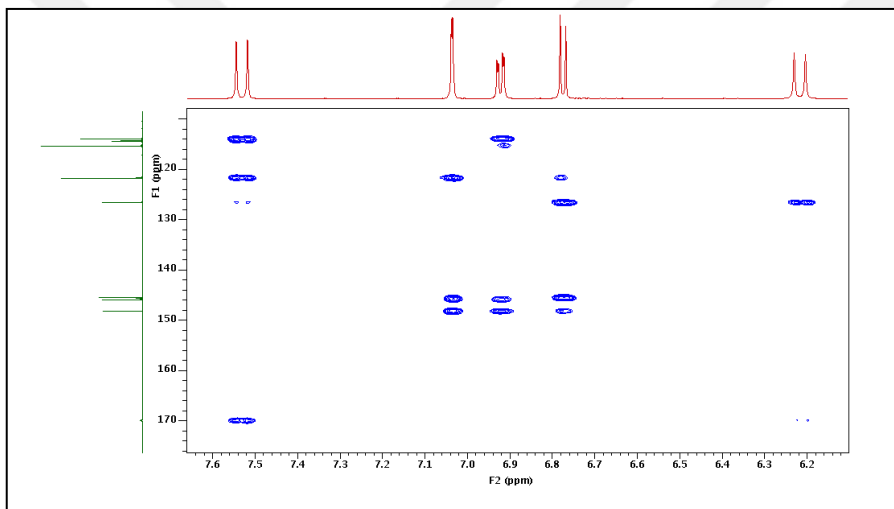
EK Şekil 2.2. E8 fraksiyonu ile 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E8-2 bileşğine ait a) ^1H (Proton), b) (Karbon), c) HMBC, d) HSQC, e) COSY, f) DEPT NMR analizi sonuçları



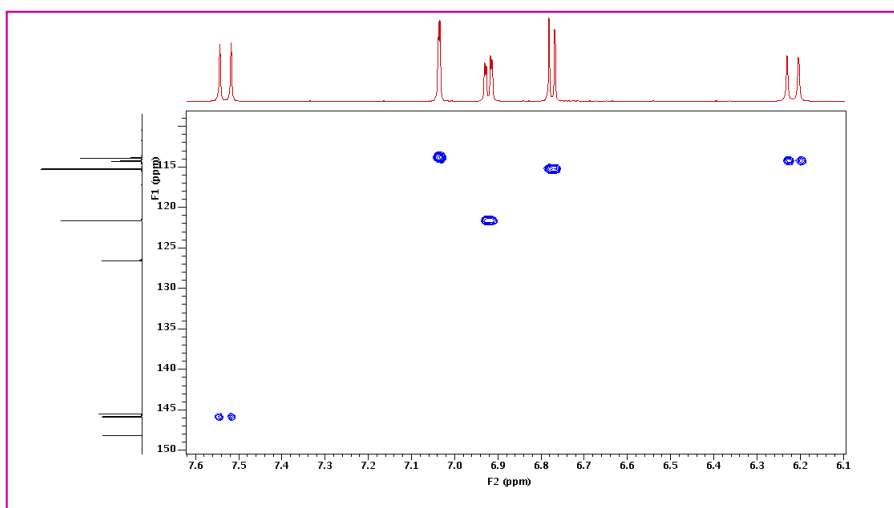
a) E8-3 bileşığının ^1H (Proton) NMR spektrumu



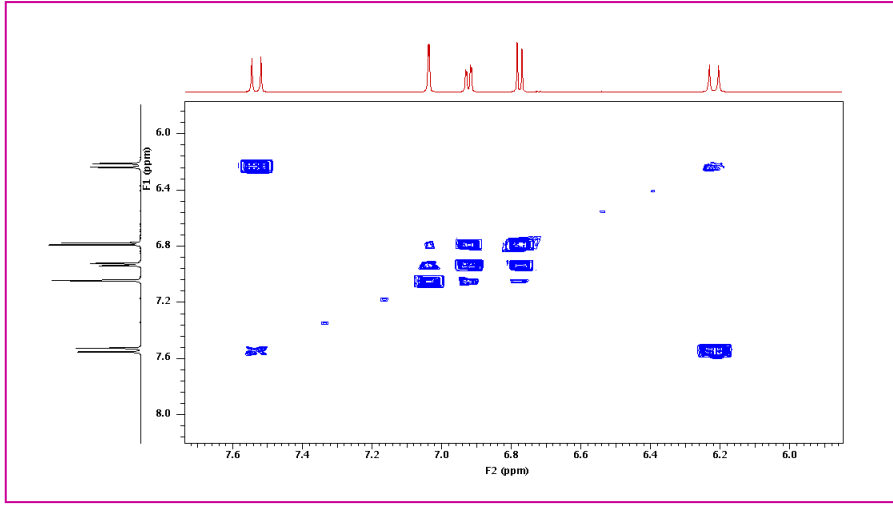
b) E8-3 bileşiminin ^{13}C (Karbon) NMR spektrumu



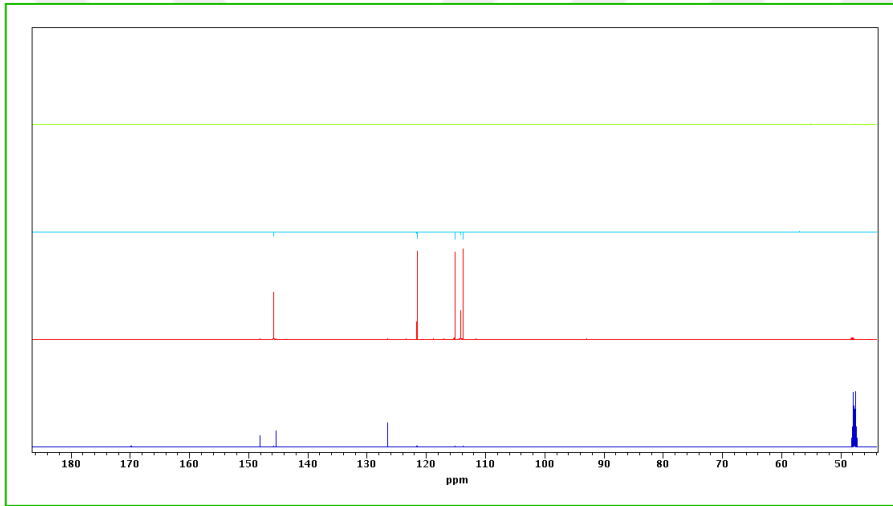
c) E8-3 bileşiminin HMBC NMR spektrumu



d) E8-3 bileşiminin HSQC NMR spektrumu

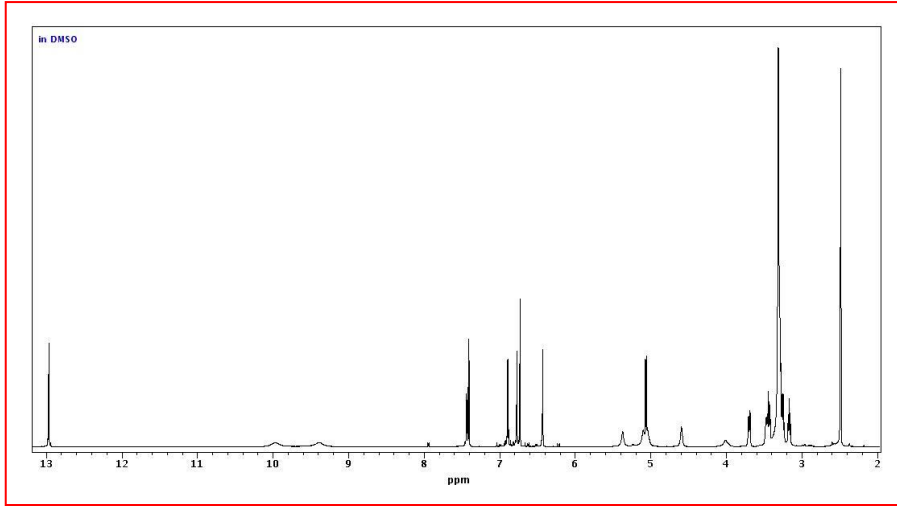


e) E8-3 bileşığının COSY NMR spektrumu

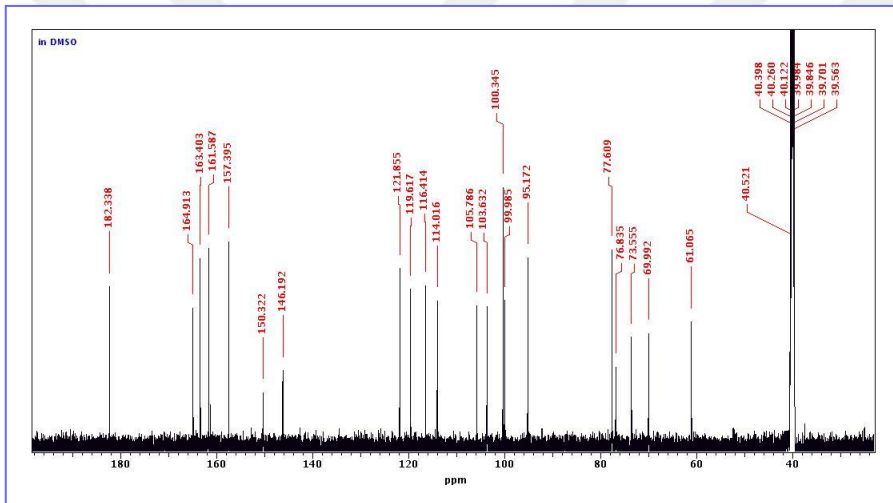


f) E8-3 bileşığının DEPT NMR spektrumu

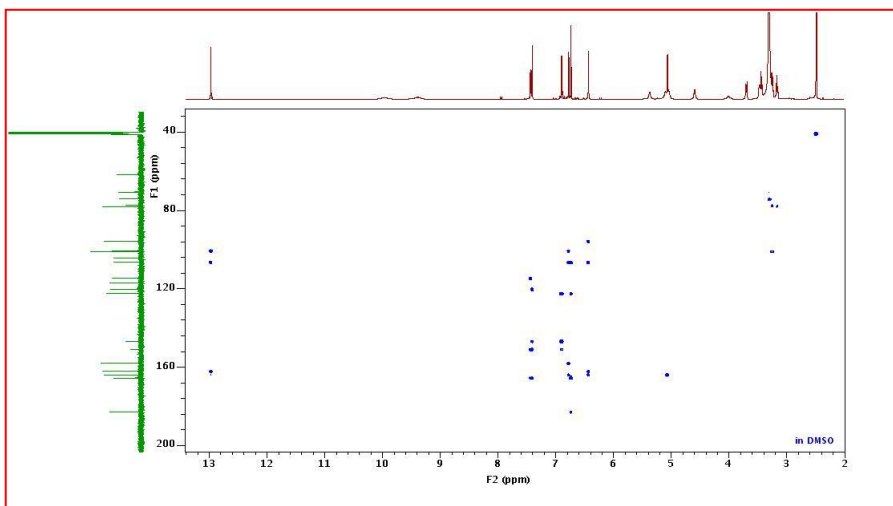
EK Şekil 2.3. E8 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E8-3 bileşğine ait a) ^1H (Proton), b) (Karbon), c) HMBC, d) HSQC, e) COSY, f) DEPT NMR analizi sonuçları



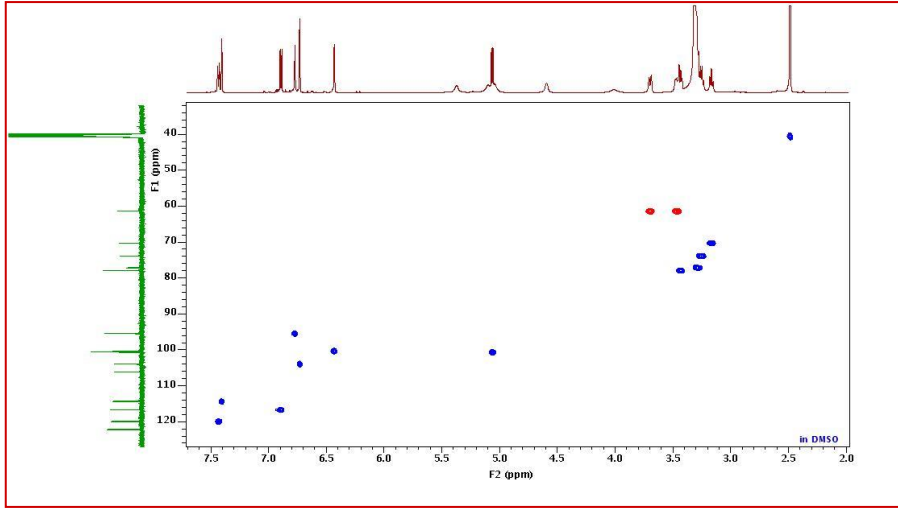
a) E8-4 bileşğinin ^1H Proton NMR spektrumu



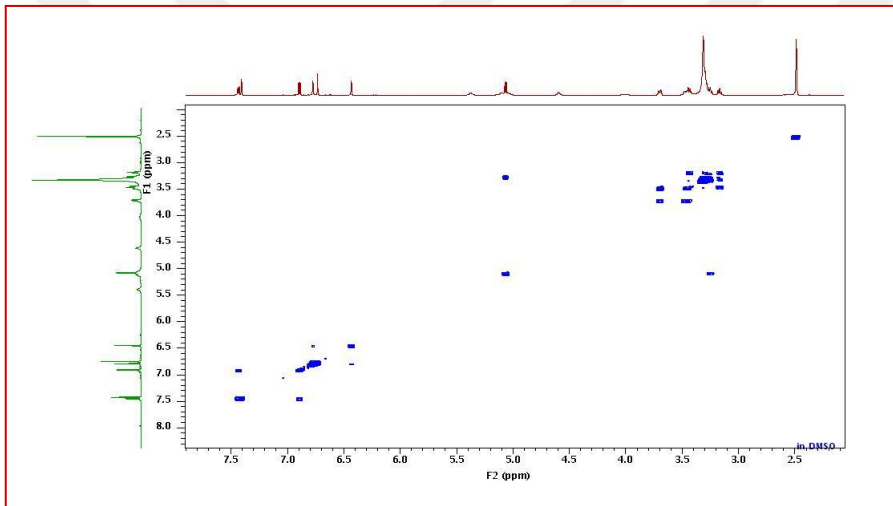
b) E8-4 bileşğinin ^{13}C Karbon NMR spektrumu



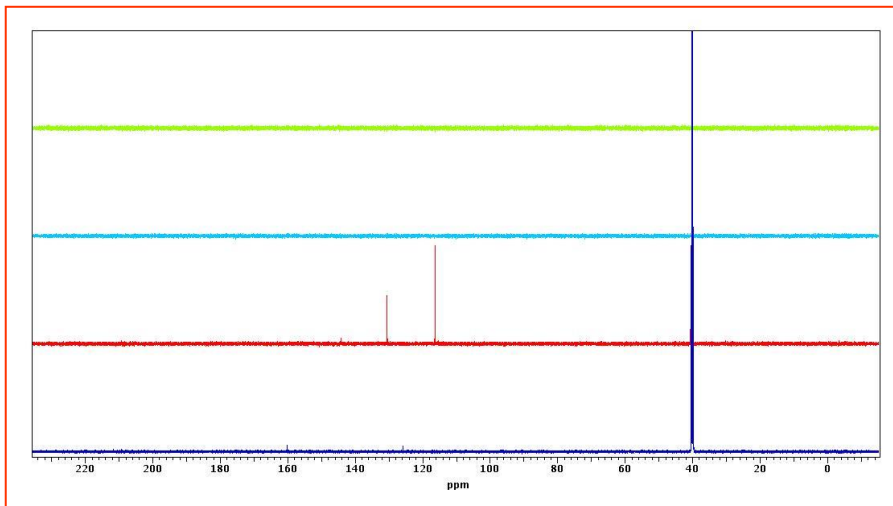
c) E8-4 bileşğinin HMBC NMR spektrumu



d) E8-4 bileşğinin HSQC NMR spektrumu



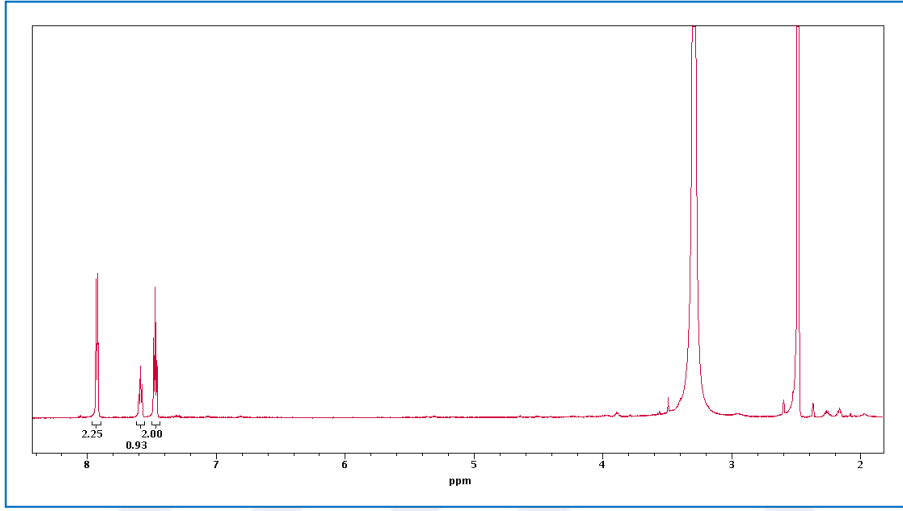
e) E8-4 bileşğinin COSY NMR spektrumu



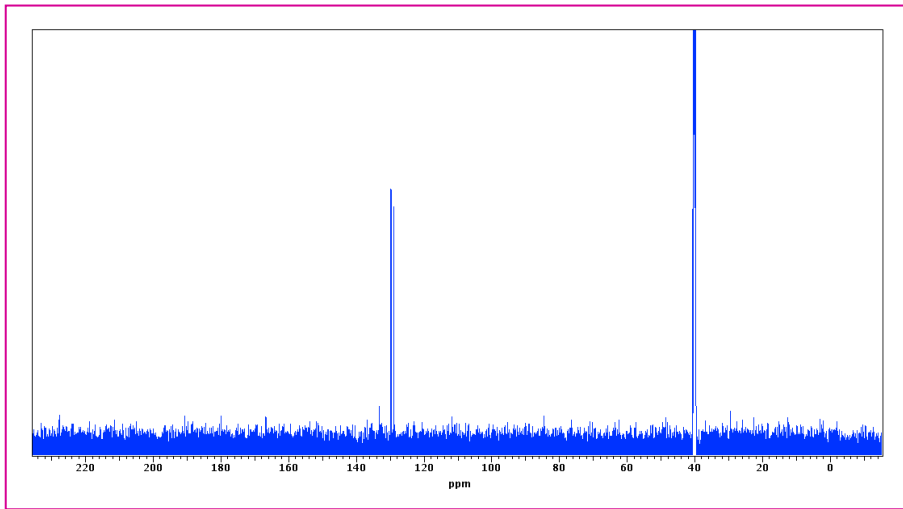
f) E8-4 bileşğinin DEPT NMR spektrumu

EK Şekil 2.4. E8 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E8-4 bileşiğine ait a) ^1H (Proton), b) (Karbon), c) HMBC, d) HSQC, e) COSY, f) DEPT NMR analizi sonuçları

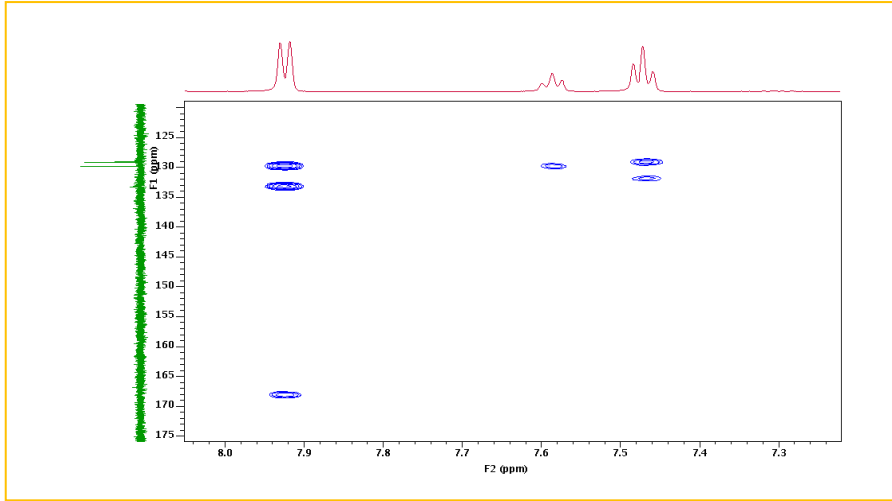
E9-1 bileşiği (Rosmarinik asit), E8 fraksiyonundan saflaştırılan E8-2 bileşiği ile aynıdır. Bu bileşiğe ait NMR verileri E8 fraksiyonunun NMR verileri arasında sunulmuştur.



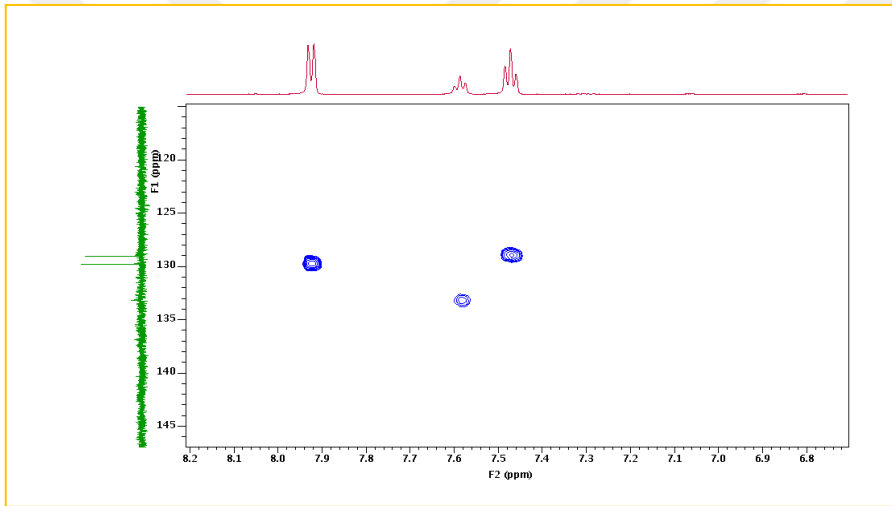
a) E9-2 bileşiğinin ^1H (Proton) NMR spektrumu



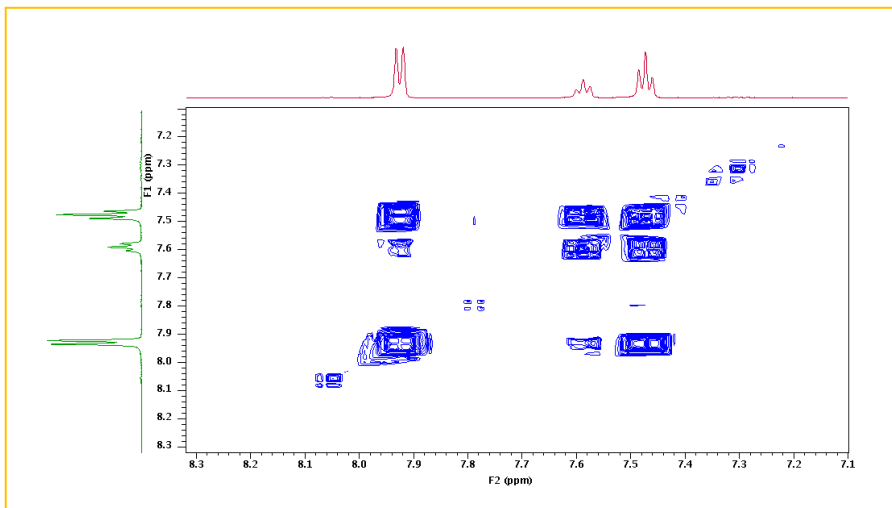
b) E9-2 bileşiğinin ^{13}C (Karbon) NMR spektrumu



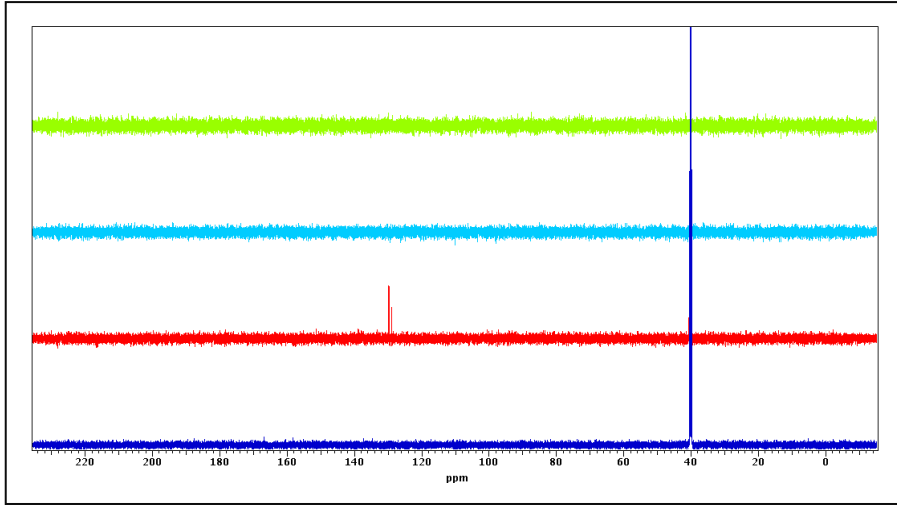
c) E9-2 bileşğinin HMBC NMR spektrumu



d) E9-2 bileşğinin HSQC NMR spektrumu

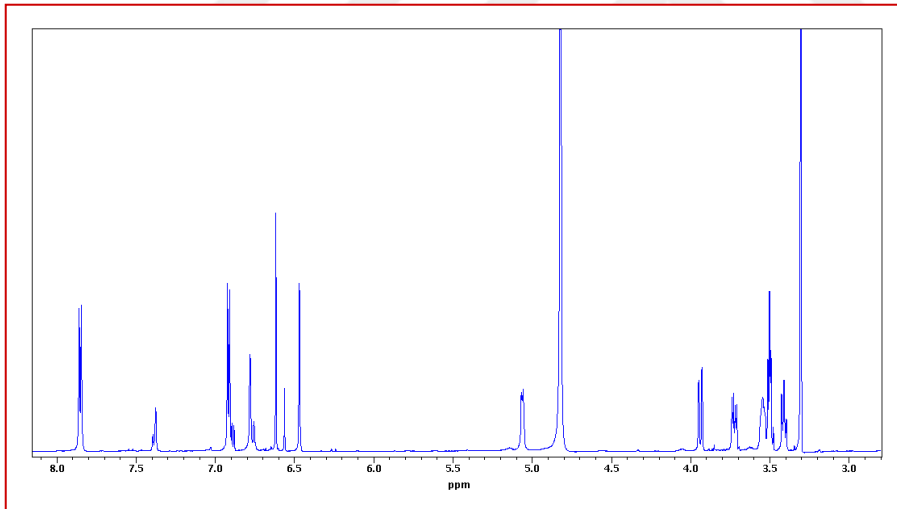


e) E9-2 bileşğinin COSY NMR spektrumu

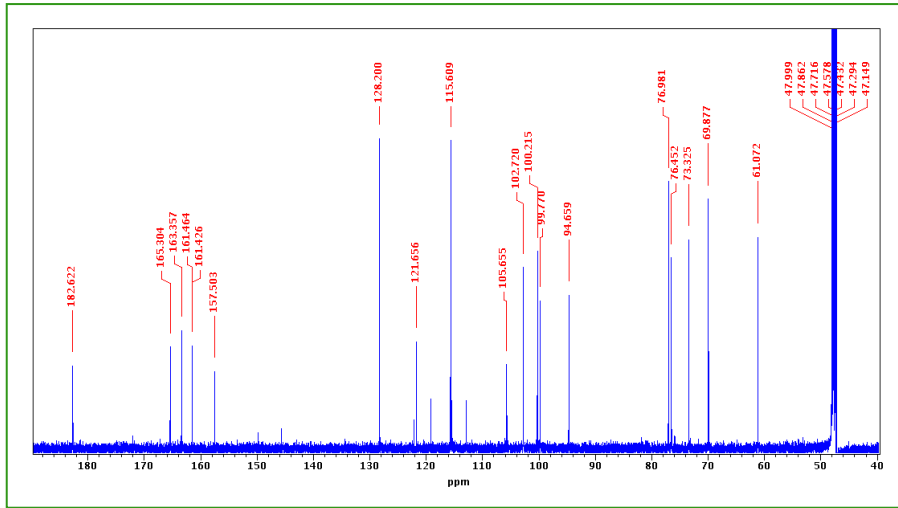


f) E9-2 bileşğinin DEPT NMR spektrumu

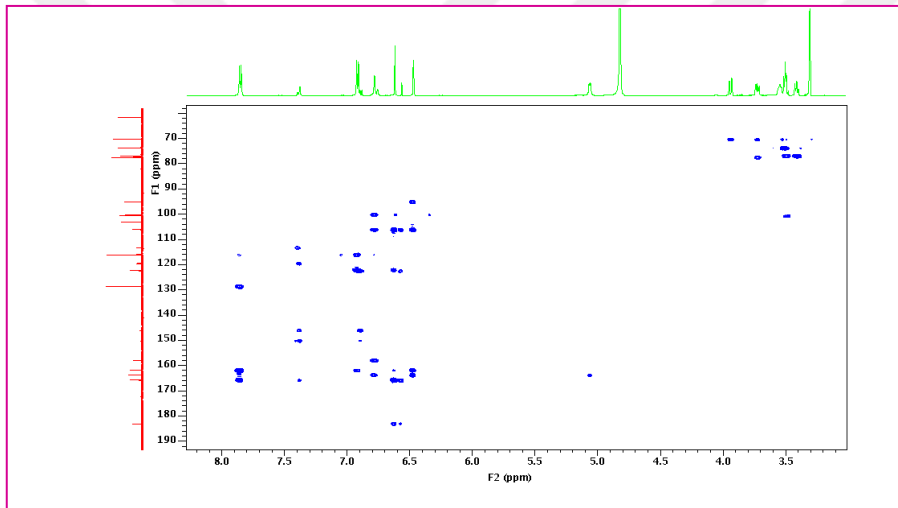
EK Şekil 2.5. E9 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E9-2 bileşğine ait a)¹H (Proton), b)(Karbon), c)HMBC, d)HSQC, e)COSY, f)DEPT NMR analizi sonuçları



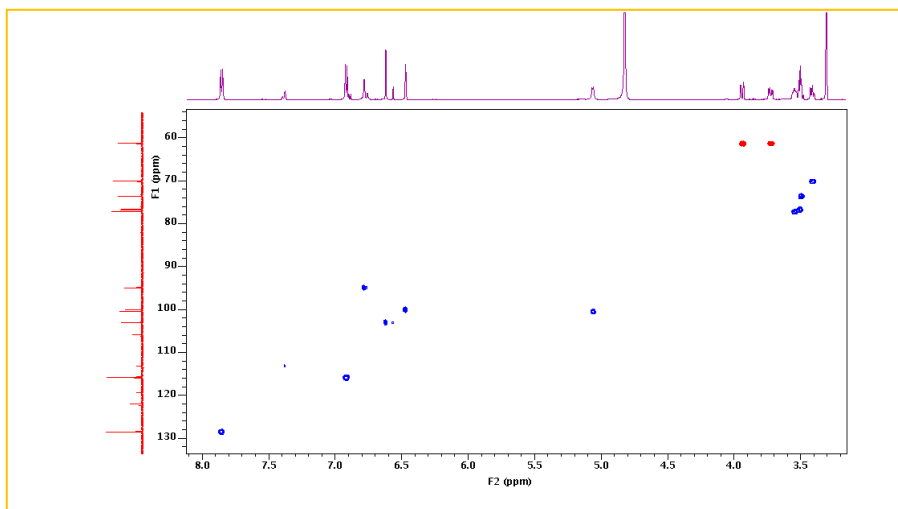
a) E10-1 bileşğinin ¹H (Proton) NMR spektrumu



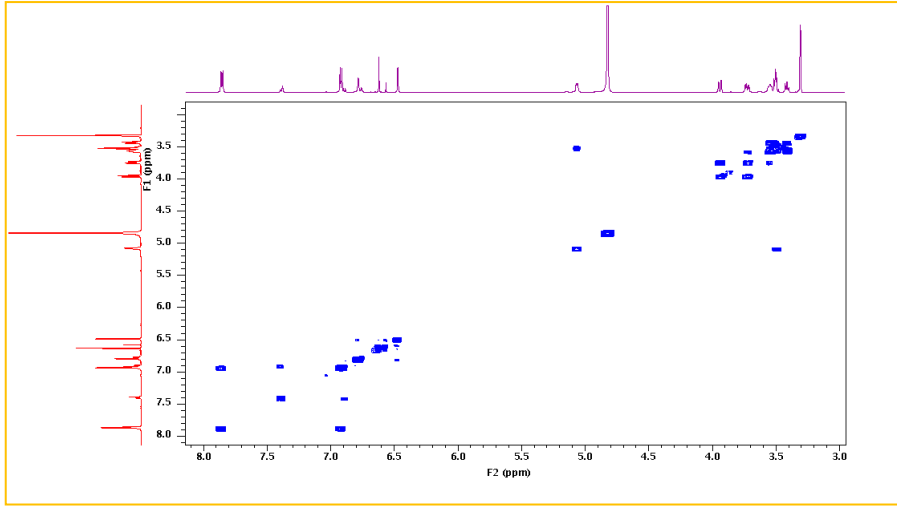
b) E10-1 bileşiğinin ^{13}C (Karbon) NMR spektrumu



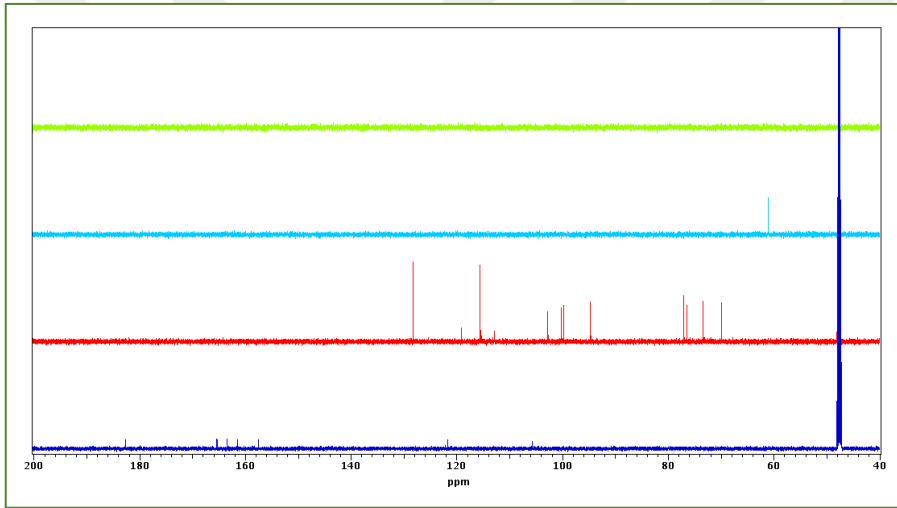
c) E10-1 bileşiğinin HMBC NMR spektrumu



d) E10-1 bileşiğinin HSQC NMR spektrumu

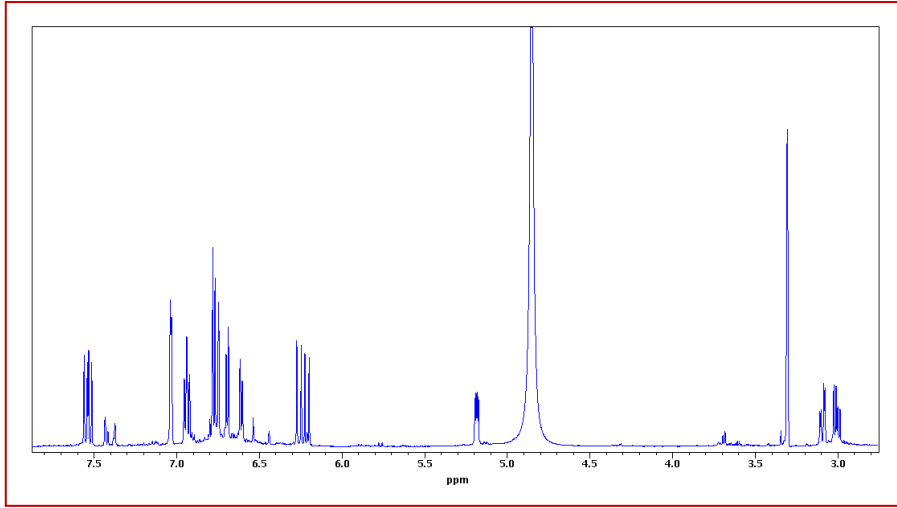


e) E10-1 bileşğinin COSY NMR spektrumu

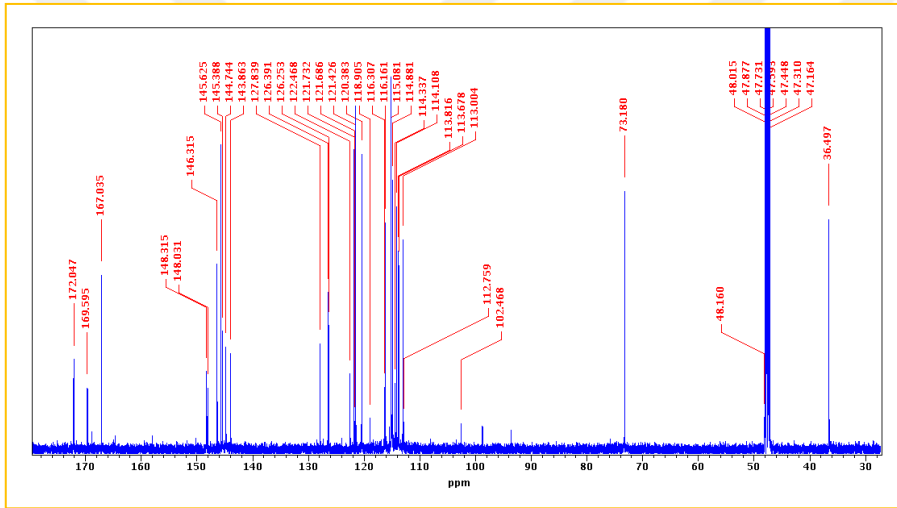


f) E10-1 bileşğinin DEPT NMR spektrumu

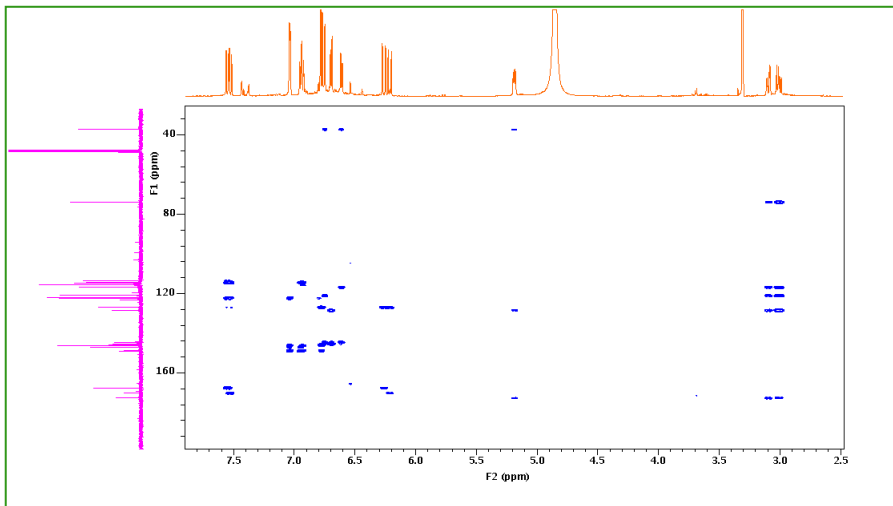
EK Şekil 2.6. E10 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E10-1 bileşğine ait ^1H (Proton), (Karbon), HMBC, HSQC, COSY, DEPT NMR analizi sonuçları



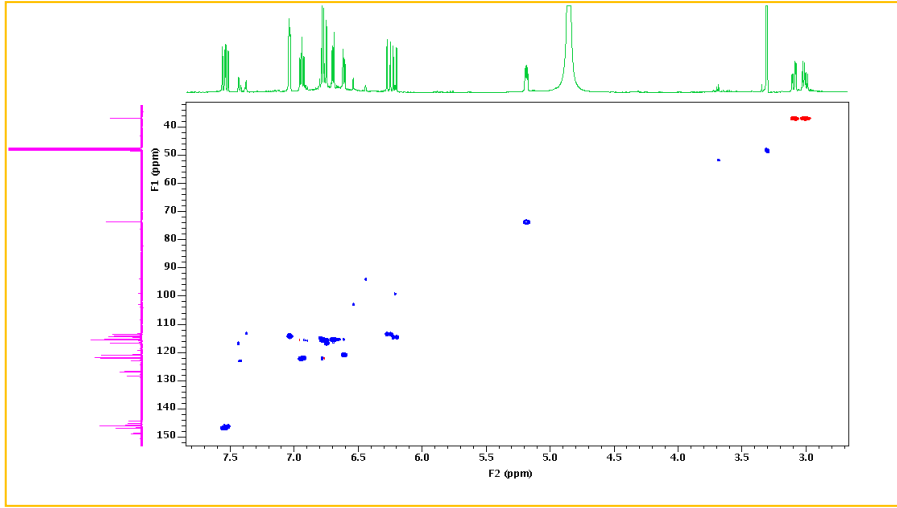
a) E10-2 bileşığının ^1H (Proton) NMR spektrumu



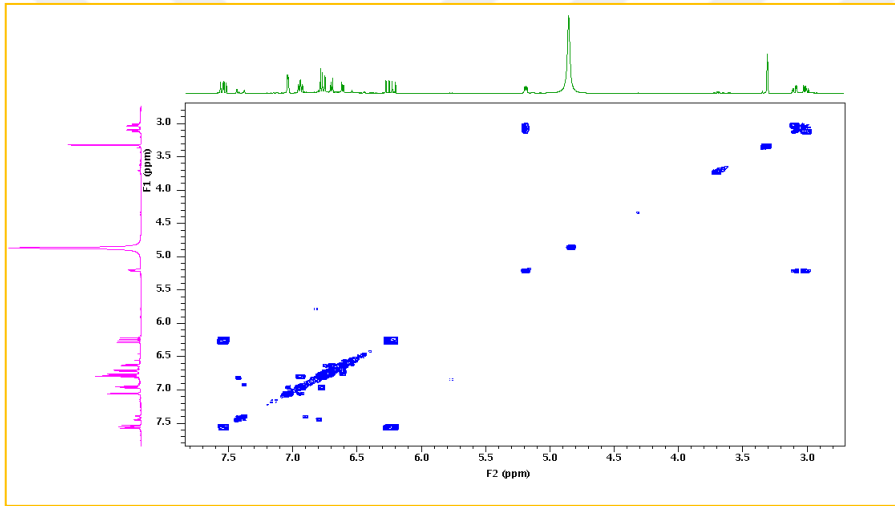
b) E10-2 bileşığının ^{13}C (Karbon) NMR spektrumu



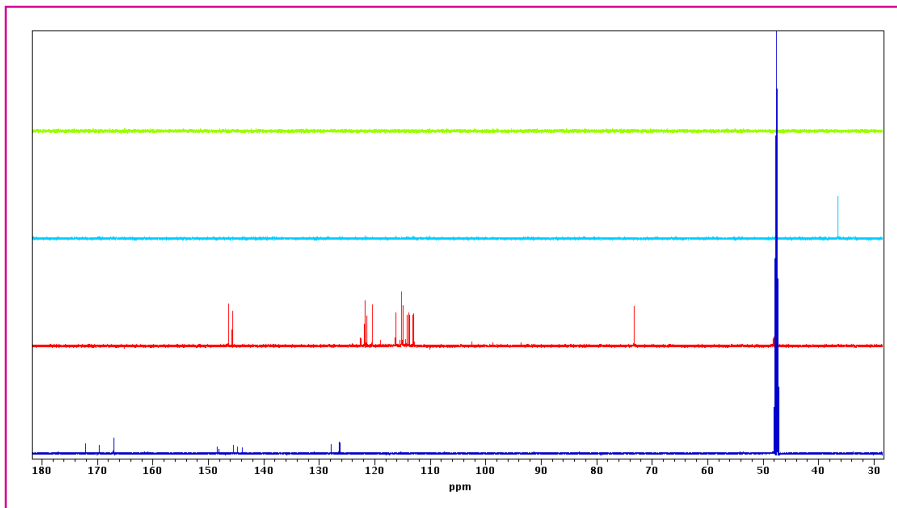
c) E10-2 bileşığının HMBC NMR spektrumu



d) E10-2 bileşğinin HSQC NMR spektrumu



e) E10-2 bileşğinin COSY NMR spektrumu



f) E10-2 bileşğinin DEPT NMR spektrumu

EK Şekil 2.7. E10 fraksiyonuyla 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak yapılan E10-2 bileşiğine ait a)¹H (Proton), b)(Karbon), c)HMBC, d)HSQC, e)COSY, f)DEPT NMR analizi sonuçları

EK 3. Tüm genom transkriptom analizlerinde çalışılan genler

EK Çizelge 3.1. SYA uygulaması yapılan H4IIE hücre dizisinde farklı olarak ifade edilen genlerin listesi

YOLAKLAR	GEN ADI	DEĞİŞİM (Kat)
İNSÜLİN DİRENCİ	cAMP responsive element binding protein 3-like 3(Creb3l3)	-3.18
	cAMP responsive element binding protein 5(Creb5)	-23.21
	carnitine palmitoyltransferase 1A(Cpt1a)	-2.04
	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit gamma(Pik3cg)	-6.69
	phosphorylase, glycogen, muscle(Pygm)	-3.70
	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3B(Ppp1r3b)	-2.41
	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3C(Ppp1r3c)	- 8.56
	ribosomal protein S6 kinase A6(Rps6ka6)	- 3.34
	ribosomal protein S6 kinase polypeptide 2(Rps6ka2)	-2.33
	tribbles pseudokinase 3(Trib3)	-2.31
PPAR SİNYAL YOLAĞI	angiopoietin-like 4(Angptl4)	-13.67
	carnitine palmitoyltransferase 1A(Cpt1a)	-2.04
	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 1(Cyp4a1)	-7.19
	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 2(Cyp4a2)	-4.69
	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 3(Cyp4a3)	-4.74
	enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (Ehhadh)	-4.25
	fatty acid binding protein 1(Fabp1)	-19.36
	fatty acid binding protein 6(Fabp6)	-10.58
	fatty acid binding protein 7(Fabp7)	-2.38
	glycerol kinase 2(Gk2)	-4.23
İMMÜN YANIT	2'-5' oligoadenylate synthetase 1K(Oas1k)	3.23
	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3(Oas3)	2.38
	FYN binding protein(Fyb)	2.52
	Fc fragment of IgE receptor 1a(Fcer1a)	2.40
	NK2 homeobox 3(Nkx2-3)	2.94
	RELT tumor necrosis factor receptor(Relt)	2.06
	RT1 class II, locus Ha(RT1-Ha)	4.55
	autoimmune regulator(Aire)	3.12
	cathepsin W(Ctsw)	2.12
	granzyme C(Gzmc)	2.03
	insülin-like growth factor 1 receptor(Igf1r)	2.35
	interleukin 1 alpha(Ill1a)	4.70

	interleukin 10(Ii10)	2.14
	interleukin 3(Ii3)	2.40
	interleukin 4 receptor(Ii4r)	2.91
	interleukin 4(Ii4)	2.98
	neurotrophin receptor associated death domain(Nradd)	2.46
	opioid receptor, kappa 1(Oprk1)	30.90
	opioid receptor, mu 1(Oprm1)	8.56
	phospholipid scramblase 1(Plscr1)	3.67
	toll-like receptor 9(Tlr9)	2.03
	tumor necrosis factor superfamily member 13b(Tnfsf13b)	2.18
İNFLAMATUAR YANIT	CD40 molecule(Cd40)	4.07
	RELT tumor necrosis factor receptor(Relt)	2.06
	S100 calcium binding protein A7A(S100a7a)	2.95
	angiotensin II receptor, type 2(Agr2)	3.29
	complement C5a receptor 1(C5ar1)	3.02
	cysteinyl leukotriene receptor 1(Cysltr1)	2.19
	free fatty acid receptor 3(Ffar3)	2.18
	indoleamine 2,3-dioxygenase 1(Do1)	2.62
	interleukin 1 alpha(Ii1a)	4.70
	interleukin 10(Ii10)	2.14
	interleukin 4 receptor(Ii4r)	2.91
	leukotriene B4 receptor(Ltb4r)	12.41
	lipoic acid synthetase(Lias)	2.39
	neurotrophic receptor tyrosine kinase 2(Ntrk2)	23.45
	neurotrophin receptor associated death domain(Nradd)	2.46
	nitric oxide synthase 2(Nos2)	2.38
	prostaglandin E receptor 2(Ptger2)	3.92
	selectin E(Sele)	3.93
	spleen associated tyrosine kinase(Syk)	12.36
	toll-like receptor 7(Tlr7)	30.61
toll-like receptor 9(Tlr9)	2.03	
İNÜLİN SALINIMI	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha 4(Atp1a4)	2.35
	FXYD domain-containing ion transport regulator 2(Fxyd2)	2.94
	adenylate cyclase 1(Adcy1)	2.59
	adenylate cyclase 5(Adcy5)	4.05
	adenylate cyclase activating polypeptide 1(Adcyap1)	2.13
	glucagon-like peptide 1 receptor(Glp1r)	2.62
	potassium calcium-activated channel subfamily M regulatory beta subunit 3(Kcnmb3)	9.08
	potassium voltage-gated channel subfamily J member 11(Kcnj11)	3.98
PI3K-AKT SİNYAL YOLAĞI	AKT serine/threonine kinase 3(Akt3)	2.37
	Bcl2-like 1(Bcl2l1)	2.13
	TEK receptor tyrosine kinase(Tek)	2.46
	angiopoietin 2(Angpt2)	5.55
	chondroadherin(Chad)	2.07

collagen type I alpha 1 chain(Col1a1)	2.73
collagen type III alpha 1 chain(Col3a1)	2.16
collagen type V alpha 2 chain(Col5a2)	3.56
collagen type VI alpha 5 chain(Col6a5)	3.30
collagen type XI alpha 2 chain(Col11a2)	2.08
fibroblast growth factor 12(Fgf12)	5.97
fibroblast growth factor 7(Fgf7)	7.64
insulin-like growth factor 1 receptor(Igf1r)	2.35
integrin subunit alpha 4(Itga4)	5.85
integrin subunit alpha 7(Itga7)	2.55
interleukin 3(IL3)	2.40
interleukin 4 receptor(IL4r)	2.91
interleukin 4(IL4)	2.98
laminin subunit alpha 2(Lama2)	2.06
laminin subunit gamma 2(Lamc2)	2.44
spleen associated tyrosine kinase(Syk)	12.36

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Seda KULABAŞ

Doğum Yeri: Alaşehir/MANİSA

Doğum Tarihi: 02/01/1989

EĞİTİM DURUMU

Lisans Eğitimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 2006-2010.

Yüksek Lisans Eğitimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı, 2010-2013.

Doktora Eğitimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı, 2013-2018.

Formasyon Eğitimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Eğitim Fakültesi

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce / YÖKDİL: 81.25

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

1. Deccaux W. F. G. Kapche, Nadège M. Lekane, **Seda S. Kulabas**, Hande Ipek, Tugba T. Tok, Bonaventure T. Ngadju, Ibrahim Demirtas, Tugba B. Tumer. Aryl-benzofuran Derivatives from the Stem Bark of Calpocalyx Dinklagei Attenuate Inflammation. Phytochemistry, 141, 2017, 70–79.

2. Tumer T.B, Onder F.C, Ipek H, Gungor T, **Savranoglu S**, Tok T.T, Celik A, Ay M. Biological evaluation and molecular docking studies of nitro benzamide derivatives with respect to in vitro anti-inflammatory activity. Int Immunopharmacol. 2016, Dec 15; 43:129-139.

3) Tumer TB, **Savranoglu S**, Atmaca P, Terzioglu G, Sen A, Arslan S, Modulatory Role of GSTM1 Null Genotype on the Frequency of Micronuclei in Pesticide-Exposed Agricultural Workers, Toxicology and Industrial Health, Toxicol Ind Health. 2016 Dec; 32(12):1942-1951.

4) Savranoglu S, Tumer T.B. Inhibitory effects of *Spirulina platensis* on carcinogen-activating cytochrome P450 isozymes and potential for drug interactions. *International Journal of Toxicology*, 2013, 32(5): 376-384.

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

1. **Seda Savranoglu Kulabaş**, Hande İpek, Şevki Arslan, Ali Rıza Tüfekçi, İbrahim Demirtaş, Tuğba Boyuneğmez Tümer. Ethyl acetate extract of *Lavandula stoechas* increased glucose uptake, phosphorylation of AKT and expression of lipoprotein lipase in insulin resistant C2C12 muscle cells. 3rd International Conference on Natural Products Utilization From Plants to Pharmacy Shelf, 18-21 October 2017, Bansko, Bulgaria.

2. Hande İpek, **Seda Savranoglu Kulabas**, Ali Rıza Tufekci, Ibrahim Demirtas, Tugba Boyunegmez Tumer. *Lavandula stoechas*: Anti-Inflammatory Effects And Active Components. 3rd International Conference on Natural Products Utilization From Plants to Pharmacy Shelf, 18-21 October 2017, Bansko, Bulgaria.

3. Tugba Boyunegmez Tumer, Berkay Yılmaz, Begum Kurt, Saliha Busra Kurt, Kemal Melik Taskin, **Seda Savranoglu Kulabas**. A Synthetic Analog Of Novel Phytohormones Strigolactones Attenuates Inflammation and Improves İnsülin Response In Vitro. 3rd International Conference on Natural Products Utilization From Plants to Pharmacy Shelf, 18-21 October 2017, Bansko, Bulgaria.

4. Tumer T.B., **Kulabas S.S**, İpek H., Tufekci A.R., Arslan S, Demirtaş I. *Lavandula stoechas*: Its differential medicinal use in Anatolia and ameliorative potential for metabolic syndrome. PSE International Symposium "New & Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary & Welfare" September 17-20, 2017, Francavilla al Mare, Chieti, Italy, ss.58.

5. **Kulabas S.S.**, Ipek H., Tufekci A.R., Gul F., Demirtas I., Tumer T.B. Subfraction Obtained From Ethylacetate Extract of *Lavandula Stoechas* Effectively Restrains Gluconeogenic Glucose Production in Hepatic Cells and Improves Signaling in İnsülin Resistant Myotubes, PSE International Symposium "New & Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary & Welfare" September 17-20, 2017, Francavilla al Mare, Chieti, Italy, ss.80.

6. **Seda Savranoglu Kulabas**, Hande Ipek, Ali Rıza Tüfekci, Ibrahim Demirtas, Tugba Boyunegmez Tumer. "Luteolin from of *Lavandula stoechas* substantially inhibited the expression of gluconeogenic enzymes in hepatic cells.", IUPAC 29th International

Symposium on the chemistry of natural products and the 9th International conference on Biodiversity, İzmir, Türkiye, 24-27 Eylül 2016, pp.107.

7. Tugba B. Tumer, Deccaux W. F. G. Kapche, Nadège M. Lekane, Hande Ipek, **Seda Savranoglu**, Tugba Taskin Tok, Bonaventure T. Ngadjui, Ibrahim Dermitas. "Two novel compounds dinklagein A and B from *Calpocalyx dinklagei* harms: anti-inflammatory activity and molecular docking ", IUPAC 29th International Symposium on the chemistry of natural products and the 9th International conference on Biodiversity, İzmir, Türkiye, 24-27 Eylül 2016, pp.53-54.

8. Hande İpek, **Seda Savranoglu**, Ali Rıza Tüfekçi, Fatih Gül, İbrahim Demirtaş, Tuğba Boyuneğmez Tümer. Apigenin and luteoline were identified as active anti-inflammatory constituents of *Lavandula stoechas* by bioassay guided fractionation. 41st FEBS congress 3-8 september 2016 in Kuşadası, Turkey, The FEBS Journal 283 (Suppl. 1) (2016), ss.358.

9. Hande İpek, **Seda Savranoglu**, Ali Rıza Tüfekçi, İbrahim Demirtaş, Tuğba Boyuneğmez Tümer, "*Lavandula stoechas* bitkisinin RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde potansiyel anti-inflamatuar etkinliği", Türk Biyokimya Kongresi, Antalya, Türkiye, 3-6 Kasım 2015, cilt.40, no.S1, ss.8.

10. **Seda Savranoglu**, Hande İpek, Şevki Arslan, Ali Rıza Tüfekçi, İbrahim Demirtaş, Tuğba Boyuneğmez Tümer, "*L. stoechas* Bitkisinin İnsülin Direncine Karşı İyileştirici Aktivitesi ve Moleküler Mekanizmaları", Türk Biyokimya Kongresi, Antalya, Türkiye, 3-6 Kasım 15, cilt.40, no.S1, ss.95-96.

11. Tuğba Boyuneğmez Tümer, Ferah Cömert Önder, Hande İpek, Tuğba Güngör, **Seda Savranoglu**, Mehmet Ay, Ayhan Çelik. Sentezlenen Bazı Nitro Benzamit Türevlerinin Raw 264.7 Hücre Hattında İnflamasyon Üzerine Etkileri, 27.Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos, 2015, Çanakkale, Türkiye, no.S-İL007, ss.492.

12. **Seda Savranoglu**, Tuğba Tümer, "Diyetsel Takviye Spirulina'nın Sitokrom P450 İzozimleri Üzerine Etkileri ve Potansiyel İlaç Etkileşimleri", Türk Biyokimya Kongresi, İzmir, Türkiye, 3-6 Eylül 2013, cilt.38, no.S1, ss.359.

13. Tugba Boyunegmez Tumer, **Seda Savranoglu**, Pelin Atmaca, Alaattin Sen, Sevki Arslan. "Role of Genetic Polymorphism of DNA Repair Gene XRCC1 in the Modulation of DNA Damage in Farmers Occupationally Exposed to Pesticides: A Preliminary Study from Denizli, Turkey.", The 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations and 12th European ISSX Meeting, Noordwijk aan Zee, Hollanda, 17-21 Haziran 2012, pp.206.

c) Katıldığı Projeler

-Proje Adı: Sera İşçilerinde Pestisit Metabolizması ve DNA Tamirinde Rol Alan Genlerdeki Polimorfizmler ile Sitogenetik Hasar Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi (2010/113), ÇOMÜ-BAP Araştırma Projesi, 2010-2013, (Araştırmacı).

-Proje Adı: Spirulina Doğal Preparatının Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkilerinin Moleküler Düzeyde Aydınlatılması (111T582), TÜBİTAK Hızlı Destek Programı 1002, 2011-2012, (Bursiyer)

-Proje Adı: Diyetel Takviye Spirulina'nın Sıçan Karaciğer Faz II Enzimleri ile *in vivo* Etkileşimi (2012-024), ÇOMÜ-BAP Lisansüstü Tez Projesi, 2012-2013, (Araştırmacı).

-Proje Adı: Karabaş Otu (*Lavandula stoechas*) Ekstresi ve Aktif Bileşenlerinin Metabolik Sendrom Komponentlerinden İnsülin Direnci ve Dislipidemide Potansiyel İyileştirici Etkisi ve Hedef Mekanizmalarının Moleküler Düzeyde Aydınlatılması, TÜBİTAK, Kariyer Projesi, 3501, 2012-2016, (Bursiyer).

-Proje Adı: *Lavandula stoechas*'ın Primer ve Sekonder Antidiyabetik Aktivitesinin Biyoaktivite Rehberli Fraksiyonlama ile Moleküler Düzeyde Aydınlatılması, ÇOMÜ-BAP Lisansüstü Tez Projesi, (FDK-2017-1132), 2017→ (Araştırmacı).

-Proje Adı: Antiinflatuar biyoaktif fenolik bileşiklerin doğal kaynaklardan absorpsiyonunda yenilikçi protein matris teknolojilerinin geliştirilmesi ve karakterizasyonu, Bağımsız Araştırma Projesi, ÇOMÜ-BAP, (1268), 2017→ (Araştırmacı).

d) Kazanılan burslar:

- 16th FEBS Young Scientists' Forum (YSF) 31st August 2016, Poster ve sözlü sunum bursu
- PSE International Symposium "New & Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary & Welfare, September 17-20, 2017, Francavilla al Mare, Chieti, Italy, seyahat bursu.

e) Sertifikalar

- *Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası*, ÇOMÜ-DAM, Mayıs 2013, Çanakkale.
- *Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi Kurs sertifikası*, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs 2012, İzmir.

- *Gen Klonlaması Sertifikası*, Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİLTEM), Şubat 2012, Aydın.
- *SPSS ile Temel Biyoistatistik Uygulamaları Sertifikası*, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi AD, Sürekli Eğitim Merkezi, Eylül 2012, Çanakkale.

f) Bilinen Deneysel Yöntemler

- Memeli Hücre Kültüründe Biyoaktivite Çalışmaları
- PCR analizleri
- Hücre ve Dokudan Total Protein İzolasyonu
- Elektroforetik Yöntemler
- Nükleik Asit (DNA, RNA) İzolasyon Yöntemleri
- Western Blot Analizi
- Spektrofotometrik Yöntemler
- Biyokimyasal Analizler

g) Dernek Üyelikleri:

- Türk Biyokimya Derneği (TBD)
- Phytochemical Society of Europe (PSE)

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : -

İLETİŞİM

E-posta Adresi : sedasavranoglu@gmail.com

KAYNAKLAR

- Ayral N. 1997. Lavandula stoechas Bitkisinin Uçucu Yağının ve Uçucu Olmayan Organik Bileşenlerinin ncelenmesi ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s, 176.
- Cavanagh H., & Wilkinson J. 2002. Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy research*, 16(4): 301-308.
- Chu C. J., & Kemper K. J. 2001. Lavender (Lavandula spp.). *Longwood Herbal Task Force*, 32.
- Onar S. 2006. Bandırma (A1 (A), Balıkesir) ve Çevresinin Etnobotaniği, Yüksek Lisans

- Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.
- Öztürk B., Konyalıoğlu S., Kantarcı G., & Çetinkol D. 2005. İZMİR YÖRESİNDEKİ YABANI Lavandula stoechas L. subsp. stoechas TAKSONUNDAN ELDE EDİLEN UÇUCU YAĞIN BİLEŞİMİ, ANTİBAKTERİYEL, ANTİFUNGAL VE ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ. Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi, 15(1).
- Pattnaik S., Subramanyam V. R., Bajaji M., & Kole C. R. 1997. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. Microbios, 89(358): 39-46.
- Sarıkan I. 2007. Kazdağları yöresinin geleneksel ilaçlarının saptanması. Ege Üniversitesi.
- Yenici N. 1999. Lavandula stoechas Bitkisinin Özellikleri ve Fibrinolitik Sisteme Etkisinin Araştırılması. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.