

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

Hypericum perforatum L. TIBBİ BİTKİSİNDEN ELDE
EDİLECEK EKSTRAKTLARLA OBEZİTE VE İNSÜLİN
DİRENCİ İLE İLGİLİ MARKÖRLERİN 3T3- L1 HÜCRE
HATLARINDA *In vitro* ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİHAL BÜŞRA TOKGÖZ

AĞUSTOS/2019

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

***Hypericum perforatum* L. TIBBİ BİTKİSİNDEN ELDE**
EDİLECEK EKSTRAKTLARLA OBEZİTE VE İNSÜLİN
DİRENCİ İLE İLGİLİ MARKÖRLERİN 3T3- L1 HÜCRE
HATLARINDA *In vitro* ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİHAL BÜŞRA TOKGÖZ

AĞUSTOS/2019

MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

Hilal Büşra Tokgöz tarafından hazırlanan *Hypericum perforatum* L. TIBBİ BİTKİSİNDEN ELDE EDİLECEK EKSTRAKTLARLA OBEZİTE VE İNSÜLİN DİRENCİ İLE İLGİLİ MARKÖRLERİN 3T3- L1 HÜCRE HATLARINDA *In vitro* ANALİZİ başlıklı tezin 22/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

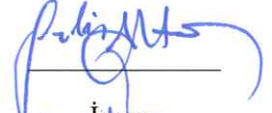
TEZ SINAV JÜRİSİ

Dr. Öğretim Üyesi Filiz ALTAN (**Danışman**)
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Reşat ÜNAL
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Dr.Öğr. Üyesi Hilal Betül KAYA AKKALE
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa

İmza



İmza



İmza



ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Ömür BAYSAL
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza



Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Hilal Büşra TOKGÖZ



ÖZET

***Hypericum perforatum* L. TIBBİ BİTKİSİNDEN ELDE EDİLECEK EKSTRAKTLARLA OBEZİTE VE İNSÜLİN DİRENCİ İLE İLGİLİ MARKÖRLERİN 3T3- L1 HÜCRE HATLARINDA *In vitro* ANALİZİ**

Hilal Büşra TOKGÖZ

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doktor Öğretim Üyesi Filiz ALTAN

Ağustos 2019, 114 sayfa

Obezite, sedanter yaşam tarzı, dengesiz ve kötü beslenme, çevresel faktörler ve genetik faktörlere dayalı olarak ortaya çıkan düşük dereceli inflamatuvar bir hastalıktır. İnsülin direnci dokuların insüline verdiği yanıtta inhibisyon meydana gelmesidir ve obeziteyle paralel seyrederek, Tip II diyabetle pozitif korelasyona sahiptir. Ülkemizde ve dünyada giderek artan obezite prevalansı araştırmacıları bu konuda alternatif tedavi yolları bulmaya yöneltmektedir. Bu alternatif tedavi yollarının büyük kısmını tıbbi bitkiler oluşturmaktadır. *Hypericum perforatum* L. eski çağlardan beri tıbbi olarak değerli kabul edilen bir bitkidir. Antiobezite ve insülin direnci parametrelerini düzenleyici etkisi yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu çalışmada *Hypericum perforatum*'un 3T3-L1 adiposit hücrelerine etkisini gözlemlemek amacıyla farklı dozlarda ve farklı saat aralıklarında bitki ekstraktı uygulanan 3T3-L1 adipositleri ve herhangi bir bitki ekstraktı uygulaması yapılmamış kontrol grupları kullanılmıştır. Transkripsiyonel regülasyonu incelemek üzere tüm gruplardan RNA elde edilmiş daha sonra RNA'ların cDNA'ya dönüştürülüp insülin direnci ve obeziteyle bağlantılı olduğu bilinen ve NCBI üzerinden tasarladığımız TNF- α , PPAR- γ , Col V, IL-6, Elastin, DGAT, FAS, LPL primerlerinin transkripsiyonel ekspresyonu incelenmiştir. Analiz etmek için qPCR kullanılmıştır ve genlerin ekspresyonu housekeeping gen olan 18S ile normalize edilmiştir. Çalışma sonucunda DGAT, LPL ve Col V ekspresyonlarındaki azalma gözlemlenmiş ve bu değişimler istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Obezite, İnsülin Direnci, *Hypericum perforatum*, 3T3-L1

ABSTRACT

***In vitro* ANALYSIS OF MARKERS RELATED TO OBESITY AND INSULIN RESISTANCE WITH EXTRACTS TO BE OBTAINED FROM MEDICAL PLANT OF *Hypericum perforatum* L.**

Hilal Büşra TOKGÖZ

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Filiz ALTAN

August 2019, 114 pages

Obesity is a low-grade inflammatory disease that develops based on sedentary lifestyle, unhealthy and malnutrition, environmental factors and genetic factors. Insulin resistance is the inhibition of tissues in response to insulin and is parallel with obesity, positively correlated with type-II diabetes. The increasing prevalence of obesity in our country and in the world has led investigators to find alternative ways of treatment in this regard. Most of these alternative means of treatment are medicinal plants. *Hypericum perforatum* L. is a plant that has been considered medically valuable since ancient times. Antiobesity and insulin resistance parameters have been shown by studies that regulate the effect. In this study, 3T3-L1 adipocytes applied at different doses and at different time intervals were used to observe the effect of *Hypericum perforatum* L. on 3T3-L1 adipocyte cells and control groups without any plant application were used. RNA was obtained from all groups to examine transcriptional regulation, then transcriptional expression of RNAs transformed into cDNA and primers that were known to be associated with insulin resistance and obesity and designed via NCBI; TNF- α , PPAR- γ , Col V, IL-6, Elastin, DGAT, FAS, LPL were investigated. The qPCR was used to analyze and the expression of the genes was normalized with the 18S housekeeping gene. As a result of the study, the decrease and increase in expression of DGAT, LPL and Col V genes were found to be statistically significant.

Keywords: Obesity, Insulin Resistance, *Hypericum perforatum*, 3T3-L1 Cell Line

canım aileme,



ÖNSÖZ

“*Hypericum perforatum* L. bitkisinden elde edilecek ekstraktlar ile obezite ve insulin direnciyle ilgili olarak olası etkilerinin araştırılması” adlı ARGE 17/059 nolu bu çalışma BAP tarafından desteklenmiştir. Öncelikle Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri’ne teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini, tecrübelerini ve bilgilerini hep yanımda hissettiğim bana her zaman yol gösterici olan danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Filiz Altan’a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren Doç. Dr. Reşat Ünal hocama çok teşekkür ederim.

Hücre kültürü ile ilgili çalışmalarımızı gerçekleştirmek için kapılarını bize açan Çevre Sorunları Araştırma ve Uygulama Merkezi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı’ndan Doç.Dr. Nurdan Saraç hocama, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan bölümümüzün araştırma görevlileri Arş. Gör. Talip Zengin ve Dr.Arş.Gör. Mehmet Varol’a, ekstrakt hazırlamak için gerekli imkanı sağlayan Organik Kimya Laboratuvarı’ndan Bihter Şahin’e, tezimi düzenlemede bana yardımcı olan Efe Berk Bozkurt’a çok teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım boyunca yardımlarını benden esirgemeyen birlikte çalıştığım canım arkadaşım, meslektaşım Gülben Uytan’a çok teşekkür ederim.

Manevi olarak hep destekçim olan Kazım Özbek’e ve her zaman arkamda olan canım aileme canı gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Amaç ve Kapsam.....	1
1.2. Kaynak Özetleri.....	3
1.2.1. <i>Hypericum perforatum</i> L. bitkisi, obezite ve insülin direnci hakkında genel bilgiler.....	3
1.2.1.1. <i>Hypericum perforatum</i> L.	3
1.2.2. Obezite ve insülin direnci	11
1.2.3. Moleküler markörler olarak seçtiğimiz gen bölgeleriyle ilgili bilgiler. 14	
2. MATERYAL ve METOT.....	18
2.1. Materyal.....	18
2.1.1. Bitki materyali	18
2.1.2. Hücre hattı.....	18
2.1.3. Kimyasal materyal	19
2.1.4. Primerler	20
2.2. Metot	21
2.2.1. Bitki ekstraktının hazırlanması	21
2.2.2. Hücre kültürü çalışması	23
2.2.3. 3T3-L1 hücre hattına <i>Hypericum perforatum</i> L. ekstraktı konsantrasyon deneme çalışmaları.....	29
2.2.4. Hücrelerden RNA izolasyonu.....	31

2.2.5. RNA'dan cDNA sentezi	33
2.2.6. Moleküler markör olarak seçilen genlerin primer dizaynının yapılması	34
2.2.7. PCR reaksiyonu kurulması	38
2.2.8. Kantitatif PCR (qPCR) reaksiyonunun gerçekleştirilmesi	39
2.2.9. Kantitatif PCR sonuçlarının $2^{-\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplanması.....	41
2.2.10. Verilerin istatistikî analizinin yapılması	42
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	43
3.1. Hücre Hattıyla İlgili Morfolojik Gözlemler	43
3.1.1. Hücre kültürü çalışmaları.....	43
3.1.2. 3T3-L1 hücre hattına <i>Hypericum perforatum</i> L. ekstraktı konsantrasyon deneme çalışmaları sonuçları.....	50
3.1.3. Diferensiyel edilen hücrelere Oil Red O boyama yapılması	64
3.2. RNA izolasyon sonuçları	66
3.3. cDNA örneklerinden primerlerin çalışıp çalışmadığını gözlemek için deneme kurulması	68
3.4. Real time kantitatif PCR (qPCR) yapılması.....	70
3.4.1. qPCR sonrası elde edilen verilerin değerlendirilmesi.....	70
3.4. Tartışma.....	94
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	101
KAYNAKÇA.....	102
ÖZGEÇMİŞ.....	114

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Hypericum perforatum</i> L. bitkisinin genel görünümü (Web-1).....	4
Şekil 1.2. Hiperisinin kimyasal yapısı.....	9
Şekil 1.3. Hiperforinin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.1. Ekstraktların içinde çözündüğü alkolün uzaklaştırılması	22
Şekil 2.2. Ticari olarak satın alınan 3T3-L1 hücre hattı	24
Şekil 2.3. Hürelere farklı zaman aralıklarında, 50 µg/ml, 200 µg/ml ve 800 µg/ml <i>Hypericum perforatum</i> ekstraktı uygulanması	30
Şekil 2.4. Hürelere farklı zaman aralıklarında 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 150 µg/ml ile <i>H.perforatum</i> uygulanması.....	31
Şekil 2.5. NCBI üzerinden yapılan primer dizaynında gen ve organizmanın seçilmesi	35
Şekil 2.6. RefSeq RNA sekmesinin seçilmesi	36
Şekil 2.7. mRNA ekranı ve pick primers sekmesi	36
Şekil 2.8. Tm derecesinin ve ekzon-ekzon seçeneklerinin ayarlanması	37
Şekil 2.9. Primer ekranı.....	37
Şekil 2.10. Primer uygunluğunun belirlenmesi.....	38
Şekil 3.1. Çözülen hücrelerin görünümü	44
Şekil 3.2. Fibroblastik morfolojiye sahip 3T3-L1 hücrelerinin görünümü.....	45
Şekil 3.3. Tripsinizasyon sonrası hücrelerin görünümü.....	46
Şekil 3.4. Hücrelerin pellet olarak gözlemlenmesi	47
Şekil 3.5. Dondurulan hücrelerin kriyoviallerde saklanması	47
Şekil 3.6. Hücrelerin diferensiyeye edilmesi	48
Şekil 3.7.1. 2 Haftalık diferensiyasyon sonrası hücrelerin görünümü	49
Şekil 3.7.2. 2 Haftalık diferensiyasyon sonrası hücrelerin görünümü	49

Şekil 3.8. Metanolde çözünmüş <i>H.perforatum</i> ekstraktlarının artan dozlarda ve farklı zaman aralıklarında hücelere uygulanması	51
Şekil 3.9. Metanolün hücelere üzerindeki etkisinin gözlemlenmesi	51
Şekil 3.10. 50 µg/ml <i>H.perforatum</i> ekstraktının hücelere olan etkisi	52
Şekil 3.11. 200 µg/ml <i>H.perforatum</i> ekstraktının hücelere olan etkisi	52
Şekil 3.12. 800 µg/ml <i>H.perforatum</i> ekstraktının hücelere olan etkisi	53
Şekil 3.13. 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml etanolde çözünmüş <i>H.perforatum</i> ekstraktı uygulaması sonucu (mavi renk sağlıklı hücelere, turuncu renk canlı ama morfolojisi değişmiş hücelere, kırmızı renk ise sağlıklı ve ölü hücelere göstermektedir).....	54
Şekil 3.14. Hücelere etanol uygulanması.....	55
Şekil 3.15. Hücelere 50 µg/ml etanolde çözünmüş <i>H.perforatum</i> ekstraktı uygulanması.....	55
Şekil 3.16. Hücelere 100 µg/ml etanolde çözünmüş <i>H.perforatum</i> ekstraktı uygulanması.....	56
Şekil 3.17. Hücelere 150 µg/ml etanolde çözünmüş <i>H.perforatum</i> ekstraktı uygulanması.....	56
Şekil 3.18. 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml metanolde çözünmüş <i>H.perforatum</i> ekstraktı uygulaması sonucu (mavi renk sağlıklı hücelere, turuncu renk canlı ama morfolojisi değişmiş hücelere, kırmızı renk ise sağlıklı ve ölü hücelere göstermektedir).....	57
Şekil 3.19. Hücelere metanol uygulanması	57
Şekil 3.20. Hücelere 50 µg/ml metanolde çözünmüş <i>H.perforatum</i> ekstraktı uygulanması.....	58
Şekil 3.21. Hücelere 100 µg/ml metanolde çözünmüş <i>H.perforatum</i> ekstraktı uygulanması.....	58
Şekil 3.22. Hücelere 150 µg/ml metanolde çözünmüş <i>H.perforatum</i> ekstraktı uygulanması.....	59
Şekil 3.23. Artan dozlarda etanolde çözünmüş ekstrakt uygulanan 3T3-L1 adipositlerinin ve kontrol gruplarının uygulama sonrası görüntüsü.....	60
Şekil 3.24. Artan dozlarda metanolde çözünmüş ekstrakt uygulanan 3T3-L1 adipositlerinin ve kontrol gruplarının uygulama sonrası görüntüsü.....	61

Şekil 3.25. Artan dozlarda etanolde çözülmüş ekstrakt uygulanan 3T3-L1 adipositlerinin ve kontrol gruplarının uygulama sonrası görüntüsü.....	62
Şekil 3.26. Artan dozlarda etanolde çözülmüş ekstrakt uygulanan 3T3-L1 adipositlerinin uygulama sonrası görüntüsü.....	62
Şekil 3.27. Oil Red O boyama işlemi.....	64
Şekil 3.28. Oil Red O boyama sonrası hücrelerin elektron mikroskobu altında görüntüleri 1,2,3 diferansiye olmuş hücreleri; 4, diferansiye olmamış hücreleri göstermektedir (1 ve 4 10x'lik büyütme; 2 ve 3 40x'lik büyütmede alınan görüntüler).....	65
Şekil 3.29. RNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi.....	66
Şekil 3.30. 25 cm'lik flasklardaki hücrelerin dış gözlemi, RNA izolasyonu sonucunda pelletlerin gözlemlenmesi.....	67
Şekil 3.31. RNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi.....	68
Şekil 3.32. Primerlerin PCR sonrası ampikon boyutları.....	69
Şekil 3.33. DGAT erime eğrisi grafiği.....	74
Şekil 3.34. DGAT geninin bağıl mRNA ekspresyonu.....	75
Şekil 3.35. LPL erime eğrisi grafiği.....	77
Şekil 3.36. LPL bağıl mRNA ekspresyonu.....	78
Şekil 3.37. TNF- α erime eğrisi grafiği.....	80
Şekil 3.38. TNF- α bağıl mRNA ekspresyonu.....	81
Şekil 3.39. FAS geni erime eğrisi grafiği.....	82
Şekil 3.40. FAS geninin bağıl mRNA ekspresyonu.....	83
Şekil 3.41. Col-V erime eğrisi grafiği.....	85
Şekil 3.42. Col-V bağıl mRNA ekspresyonu grafiği.....	85
Şekil 3.43. IL-6 erime eğrisi grafiği.....	88
Şekil 3.44. PPAR- γ erime eğrisi grafiği.....	90
Şekil 3.45. Elastin erime eğrisi grafiği.....	92
Şekil 3.46. Elastin bağıl mRNA ekspresyon grafiği.....	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Primerlerin sınıflandırılması	20
Çizelge 2.1. cDNA sentezinin ilk adımında yer alan bileşenler	33
Çizelge 2.2. cDNA sentezinin son adımında yer alan bileşenler	34
Çizelge 2.3. PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları	38
Çizelge 2.4. PCR reaksiyonunun basamakları	39
Çizelge 2.5. qPCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler	40
Çizelge 2.6. qPCR reaksiyon basamakları	40
Çizelge 3.1 RNA örneklerinin spektrofotometrik analizi	66
Çizelge 3.2. RNA'ların spektrofotometrik analiz sonucu	68
Çizelge 3.3. Her örnek grubuna ve primere ait CT değerlerinin gösterilmesi	70
Çizelge 3.4. DGAT geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması	72
Çizelge 3.5. 18S geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması	72
Çizelge 3.6. DGAT geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi	73
Çizelge 3.7. LPL geninin CT değerleri	76
Çizelge 3.8. LPL geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi	76
Çizelge 3.9. TNF- α geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması	79
Çizelge 3.10. TNF-a geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi	79
Çizelge 3.11. FAS geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması	81

Çizelge 3.12. FAS geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi	82
Çizelge 3.13. Col-V geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması	84
Çizelge 3.14. Col-V geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi	84
Çizelge 3.15. IL-6 geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması	86
Çizelge 3.16. IL-6 geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi	87
Çizelge 3.17. PPAR- γ geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması	89
Çizelge 3.18. PPAR- γ geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi	89
Çizelge 3.19. Elastin geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması	91
Çizelge 3.20. Elastin geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi	91

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FCS	Fetal Calf Serum
FBS	Fetal Bovine Serum
mL	Mililitre
GM	Growth Medium
CO ₂	Karbondioksit
PBS	Phosphate Buffered Saline
rpm	rapid per minute
DMSO	dimetilsulfoxide
BKİ	beden kitle indeksi
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
m	metre
kg	kilogram
DGAT	diaçil gliserol asetil transferaz
LPL	lipoprotein lipaz
IL-6	interlökin-6
TNF- α	tümör nekrozis faktör
PPAR- γ	peroksizom proliferatör activated receptor- γ
Col-V	kolojen-V
FAS	fatty acid synthase

1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Tıbbi bitkilerden hazırlanan kürler, sağlığı korumak ve hastalıkları tedavi etmek için binlerce yıldır geleneksel ilaçlar olarak kullanılmıştır. *Hypericum perforatum* L. tıbbi bitkisinin etkileri 2000 yılı aşkın süredir bilinmektedir (Klemow vd., 2011). Halk arasında zihinsel gücü artırıcı, yara iyileştirici olarak ve anksiyete, depresyon, uykusuzluk, gastrit, hemoroid, iltihap gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Klemow vd., 2011).

Obezite ve Tip II diyabet tüm dünyadaki ölüm sayısını arttırmaktadır (Almind vd., 2004). İnsülin direnci, Tip II diyabetin ve diğer obezite ile ilişkili kronik hastalıkların etiyolojisinde bir kilit faktördür (Ye, 2013). İnsülin direnci, insüline duyarlı dokuda insülin kaynaklı glukoz alımının bozulduğu bir durumdur. Bu bozukluk, insülin sinyal yolunun inhibisyonunun bir sonucudur (Ye, 2013).

Obezite ve obeziteyle korelasyon içinde olan insülin direnci, Tip II diyabet, ateroskleroz, metabolik sendrom, hiperlipidemi gibi rahatsızlıkların tüm dünyada artan prevalansı ülkelerin ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir. Obezite ve insülin direnci için uygulanan ilaç tedavilerinin herkes tarafından tolere edilememesi ve obezitede beden kitle indeksi ≥ 40 kişilere uygulanan metabolik cerrahinin hastalarda farklı komplikasyonlara yol açabilmesi araştırmacıları alternatif tedavi yolları aramaya sevk etmiştir. Bu alternatif tedavi yollarının başında tıbbi bitkiler gelmektedir. *Hypericum perforatum* bitkisi üzerinde yapılan çalışmalarda bitkinin ihtiva ettiği etken maddeler sayesinde insülin direncini düşürücü ve lipid parametrelerini iyileştirici özelliğe sahip olduğu ortaya konulmuştur (Husain vd., 2011; Tian vd., 2015). Ancak

bitkinin hangi moleküler mekanizmalarla obezite ve insülin direncini düşürücü etkiye sahip olduğu henüz ortaya konulmamıştır.

Bu çalışmada bitkinin etki mekanizmasını anlayabilmek için obezite, insülin direnci ve inflamasyonla ilgili markörlerin *Hypericum perforatum* uygulanmış 3T3-L1 adipositlerinde taranması sağlanmıştır. IL-6, TNF-a, PPAR-g, Kolojen-V, Elastin, DGAT, LPL ve FAS bu proje kapsamında taranan markör genleridir. Farklı dozlarda *Hypericum perforatum* uygulanmış 3T3-L1 adipositlerinden elde edilen cDNA'larda bu markör genlerin kantitatif PCR ile analizi yapılmıştır ekspresyon seviyelerindeki değişim 18S housekeeping geni ile normalize edilmiştir.



1.2. Kaynak Özetleri

1.2.1. *Hypericum perforatum* L. bitkisi, obezite ve insülin direnci hakkında genel bilgiler

1.2.1.1. *Hypericum perforatum* L.

Türkiye’deki adı sarı kantaron, binbirdelik otu, mayasıl otu, yara otu, kan otu, kuzu kıran olan ve İngilizce kaynaklarda St. John’s Wort adıyla geçen *Hypericum perforatum* L. çok yıllık çiçekli bir bitkidir (Baytop 1999; Hışıl vd.2005; Klemow vd. 2011). *Hypericum* ismi, Yunancada kötü ruhlara karşı anlamına gelen hiper (üstü) ve eikon (ikon) kelimelerinden türemiştir (Dugoua vd., 2006)

Hypericum perforatum L., tipik olarak boyu 40 ile 80 cm arasında değişen, serbestçe dallanan çalılık şeklinde görülmektedir (Şekil 1.1). Sapları ve dalları, 1-3 cm uzunluğunda ve 0.3-1 cm genişlikte dikdörtgen, düzgün kenarlı yapraklarla kaplıdır. Olgun bitkilerin üst kısımlarında, genellikle 1-2 cm genişliğinde olan birkaç düzine beş yapraklı sarı çiçek bulunur (Klemow vd. 2011). *Hypericum perforatum* L., genellikle otlaklarda, meralarda, çayırlarda, yol kenarlarında, terk edilmiş maden ocaklarında ve taş ocaklarında yetişir (Klemow ve Raynal, 1983; Gleason ve Cronquist, 1991).

Hypericum perforatum L., Avrupa, Asya, Afrika ve Amerika’nın ılıman bölgelerinde yayılış göstermiştir (Klemow vd. 2011). *Hypericum* cinsi, *Clusaceae* familyası ve *Hypericoideae* alt familyasına dahil olan bu bitkinin tüm dünyada yaklaşık 400 türü vardır (Curtis ve Levsten 1990; Ekren vd. 2012). Türkiye’de ise 70 kadar türüne rastlanmıştır (Baytop 1999; Yıldırım vd. 2009).



Şekil 1.1. *Hypericum perforatum* L. bitkisinin genel görünümü (Web-1)

***1.2.1.1.1. Hypericum perforatum* L. bitkisinin taksonomik sınıflandırması**

Alem: Bitkiler

Alt alem: Yeşil bitkiler

İnfra-alem: Kara bitkileri

Üst şube: Embriyofitalar

Şube: Damarlı bitkiler

Alt şube: Tohumlu bitkiler

Sınıf: Çift çenekliler

Üst takım: Gülgiller

Takım: *Malpighales* (Sütleğengiller)

Aile: *Hypericaceae*

Cins: *Hypericum*

Tür: *Hypericum perforatum* L. (Sarı kantaron)

1.2.1.1.2. *Hypericum perforatum* L.'nin tıbbi önemi

Hypericum perforatum L. 2000 yılı aşkın bir süredir tıbbi olarak değerli bir bitki olarak kabul edilmiştir. Eski çağlarda yaşamış olan hekimler, bitkiyi yara iyileştirici ve ağrıyı hafifletici olarak önermişlerdir. 1525'te, Paracelsus bitkiyi depresyon ve melankoli tedavisinde tavsiye etmiştir. *Hypericum perforatum* L. nesiller boyunca tıbbi bir bitki olarak anksiyete, depresyon, uykusuzluk, gastrit, hemoroid, iltihap, yara, kesik ve yanık tedavisinde kullanılmıştır (Klemow vd. 2011).

Günümüzde *Hypericum perforatum*'un antidepresan aktivitesi hem klinik hem de klinik olmayan çalışmalarla ispat edilmiştir (Muller vd. 1998; Nathan vd. 1999; Husain vd. 2011). Linde ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Hypericum perforatum* L. bitkisinin düşük ve orta dereceli depresyonların tedavisinde antidepresan ilaçlara yakın nitelikte etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Linde vd., 1996). *Hypericum perforatum*'un ihtiva ettiği flavonoidler, biflavonoidler, floroglücinoller, naftodiantronlar, ksanfonlar, proantosiyanidinler, fenolik asit, uçucu yağlar ve diğer fenolik bileşiklerin, bitkinin antidepresan aktivitesinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Barnes vd., 2001; Hostettmann ve Wolfender, 2005). Özellikle hiperisin ve hiperforin gibi bileşiklerinin birincil olarak antidepresan aktivitesinden sorumlu olduğu rapor edilmiştir (Butterweck vd., 1997).

Kanser tedavilerinde hem kanser hücreleri hem de sağlıklı hücreler etkilenir. Kanser tedavileri radyoterapi, kemoterapi ya da ameliyat gibi süreçleri içermektedir (Boik, 2001; Milis-Torres vd., 2010). Antikanser araştırmaları fitoterapinin sunabileceği çok

şey olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar, *H. perforatum*'un, tümör hücrelerinin çoğalmasını engellediğini ve hem melanom hem de melanom dışı cilt kanseri hücrelerini tedavi edebildiğini gözlemlenmiştir (Klemow vd., 2011). *H. perforatum*'un antikanser mekanizması, memeli hücrelerinde proteolitik bölünmeyi tetikleyen kaspazların sistein proteazları aktive ederek apoptozun indüklenmesini içermektedir (Klemow vd., 2011).

Hiperforin ve hiperisin, *H. perforatum*'un antikarsinojenik aktivitesinden sorumlu ana bileşenler olarak tanımlanmıştır. Hiperforinin, tümör büyümesini inhibe etme etkisi vardır ve sitotoksik aktivitesi, insan hücre hatlarına karşı incelenmiştir ve tümör büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Hostanska vd., 2003; Schmitt vd., 2006) .

Antioksidanlar, insan vücudunu Alzheimer hastalığı, ateroskleroz, kanser, diabetes mellitus, iskemik kalp hastalığı, Parkinson hastalığı, romatizma ve hatta yaşlanma süreci gibi birçok kronik rahatsızlığa neden olan oksidatif strese karşı korur (Aruoma, 2003; Hemati vd., 2010). *H. perforatum*'un antioksidan potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (Zou vd., 2004). *H. perforatum* özütünün sıçanlarda beyin malondialdehit, glutatyon peroksidaz ve glutatyon seviyelerini değiştirerek etkili bir antioksidan olduğu görülmüştür (El-Sherbiny vd., 2003). Ayrıca, Sanchez-Muniz ve arkadaşları (2012), standart *H. perforatum* özütünün lipit peroksidasyonunu inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir.

İnflamasyon, vasküler dokunun zararlı uyarılara kompleks bir tepkisidir. Steroid ve steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların ciddi yan etkilerinin bir sonucu olarak daha güvenli ve daha etkili antiinflamatuvar ilaçların geliştirilmesine talep vardır. Bu nedenle araştırmacıların bitkisel ilaç geliştirmeye olan ilgileri artmıştır (Hyun ve Kim, 2009; Shokrzadeh ve Saeedi Sarvari, 2009).

Farklı araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalar *H. perforatum*'un ümit verici bir antiinflamatuvar ajan olduğunu göstermiştir. Bunun kanıtı olarak kolon enflamasyonu ile ilişkili kan ve bağırsak enzimleri düzeylerinin azaldığı çalışma (Dost ve ark., 2009) ve *H.perforatum* ile beslenen sıçanlarda gözlenen daha düşük mide ülseri insidansını gösteren çalışma gösterilebilir (Çaycı ve Dayioğlu, 2009).

H. perforatum'un iki olası antiinflamatuvar etki mekanizması olduğu düşünülmektedir. İlk etki mekanizmasının *H. perforatum* özütünün, kronik enflamasyonda önemli rol oynayan siklooksijenaz-2, interlökin-6 ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi proinflamatuvar genlerin ekspresyonunu indirgemesi olduğu düşünülmektedir. (Tedeschi vd., 2003). Bir başka olası mekanizma prostaglandin (PG) sentezinin psödohiperisin ve hiperforin tarafından inhibe edilmesi olduğu düşünülmektedir (Bukahri vd., 2004; Hammer vd., 2007).

Yapılan deneylerde diyabetik sıçanlarda ve yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda şeker ve lipit metabolizmasında *Hypericum perforatum*'un iyileştirici etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (Amini vd., 2009; Tian vd., 2015). *Hypericum perforatum* L. yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda artan kan plazma glukozundaki artışı önemli ölçüde inhibe etmekte ve insulin seviyesini düşürmektedir. Ayrıca bu sıçanların dokularında meydana gelen yağ birikimini de normalize etmektedir (Husain vd., 2011). Kaslarda lipit birikimi obezite ve insulin direnciyle pozitif korelasyon göstermektedir. Tian ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada *Hypericum perforatum* L. ekstraktının yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlara verilmesiyle kaslarda lipit birikimi azalmıştır ve *Hypericum perforatum* L. ekstraktı kan değerlerini iyileştirici etki göstermiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda bitkinin antidiyabetik, antihiperglisemik, antiobezite ve insulin direncini iyileştirici etkisi kanıtlanmıştır.

Hypericum perforatum bitkisinin yara iyileşme aktivitesini gösteren çalışma bölgesel ve oral olarak diyabetik sıçanlar üzerinde yapılmıştır. Oral formülasyonun diyabetik yaraların iyileşmesinde bölgesel tedaviden daha etkili olduğu bulunmuştur (Belwal vd., 2019). Bu bulgular *H. perforatum*'un yara iyileşmesi için etkili bir tedavi olduğunu göstermektedir.

Bu etkilerin yanı sıra *Hypericum perforatum* L. bitkisi dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu, kronik yorgunluk sendromu, obsesif-kompulsif bozukluk, mevsimsel affektif bozukluk, premenstrüel semptomların (PMS) en aza indirgenmesinde kullanılmıştır (Newall vd., 1996). PMS'li kadınlarda meme hassasiyetini, krampları ve sinirlenmeyi durdurur (Singh, 2017). Antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral ve antikanser olarak da kullanılmaktadır (Duke, 2002).

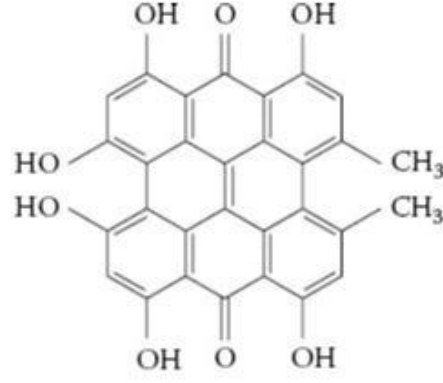
Ayrıca AIDS tedavisi, hepatit C, iştahsızlık, gastroenterit, genital herpes, kalp çarpıntısı, hemoroid, histeri, böbrek ve akciğer hastalıkları, menopoza nevrozu, migren, nevralji, sosyal fobi, yorgunluk, uyumakta zorluk ve kilo kaybı için de etkili olduğu gösterilmiştir (Belwal vd., 2019).

2.1.1.2. *Hypericum perforatum*'un biyoaktif bileşenleri

Yapılan araştırmalarda *H. perforatum*'un yedi grup tıbbi olarak aktif bileşiği olduğu tespit edilmiştir (Nahrstedt ve Butterwick, 1997). En yaygın sınıflar arasında naftodiantronlar, floroglükolinler ve flavonoidler (fenilpropanlar, flavonol glikozitler ve biflavonlar gibi) ve ayrıca uçucu yağlar bulunmaktadır (Bombardelli ve Morazzoni, 1995; Reuter 1998; Barnes vd., 2001; DerMarderosian ve Beutler, 2002). Bir naftodiandron olan hiperisin ve bir fluoglusinol olan hiperforin olmak üzere iki ana aktif bileşen tanımlanmıştır ve bununla birlikte, ekstrakte edilebilir bileşiklerin kabaca % 20'si biyolojik olarak aktif kabul edilmektedir (Staffeldt vd., 1994; Nahrstedt ve Butterwick, 1997; Erdelmeier, 1998).

a. Naftodiantronlar

En çok araştırılan *H. perforatum*'dan izole edilen bileşiklerin sınıfı % 0,1 ile % 0,3 arasında değişen konsantrasyonlarda olan naftodiantronlardır. (Robbers ve Tyler, 1999; Grainger-Bisset ve Wichtl, 2001; Greeson vd., 2001) En yaygın naftodiantronlar arasında hiperisin, psödohiperisin, izohiperisin ve protohiperisin bulunmaktadır (Barnes, Anderson, ve Phillipson, 2001; DerMarderosian ve Beutler 2002). Bunlardan hiperisin sarı kantaron yağlarının kırmızı rengine sorumlu antrakinondan türetilmiş bir pigmenttir ve en iyi bilinen naftodiantrondur. Hiperisin çiçeklerde, özellikle yaprakları boyunca yer alan siyah noktalarda bulunmaktadır Kimyasal yapısı nedeniyle, hiperisin yüksek oranda fotoreaktiftir (Şekil 1.2). Molekülün rezonansı ve oksijen atomları arasındaki nispeten kısa mesafeden dolayı, hidroksil hidrojen, flüoresan ışığı varlığında hidroksil oksijen ile karbonil oksijen arasında geçiş yapabilmektedir.



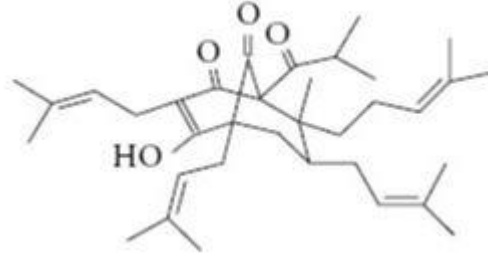
Şekil 1.2. Hiperisinin kimyasal yapısı

b. Flavonoidler

Sarı kantaronda bulunan flavonoidler, çiçeklerde ve yapraklarda %7 ile %12 arasında değişmektedir. (DerMarderosian ve Beutler, 2002, Greeson vd., 2001) Flavonoidler arasında, flavonoller (kersetin), flavonlar (luteolin), glikozitler (hipersit, izotersitrin ve rutin), biflavonlar, amentoflavon ve hiperin bulunmaktadır. Rutin konsantrasyonu %1,6 olarak bildirilmiştir. (Barnes vd., 2001).

c. Lipofilik bileşikler

Sarı kantaron ekstraktları, floroglucinol türevleri ve yağları içeren, terapötik değeri kanıtlanmış birkaç sınıf lipofilik bileşik içermektedir. %2-4,5'lik konsantrasyonlarda izole edilen hiperforin bunlardan en önemlisidir (Şekil 1.3). (Chatterjee vd., 1998; Greeson vd., 2001) Hiperforin ışık ve/veya oksijen varlığında kararsız yapı göstermektedir (Liu vd., 2005). Çeşitli araştırmacıların sayısız girişimlerine rağmen, bugüne kadar hiperforinin toplam sentezi gerçekleştirilememiştir (Nicolaou vd., 2005). Diğer floroglukolinler, adhiperforin (%0,2 -%1,9), furohiperforin ve diğer hiperforin analoglarını içermektedir.



Şekil 1.3. Hiperforinin kimyasal yapısı

d. Diğer bileşenler

H. perforatum'da çeşitli sınıflardaki diğer bileşikler tanımlanmıştır. Bunlar arasında tanenler (%3 ile %16 arasında değişir), ksantanlar (1,28 mg / 100 g), fenolik bileşikler (kafeik asit, klorojenik asit ve p-kumarik asit) ve hiperfolin bulunmaktadır. İlave bileşikler, daha az bir ölçüde asitleri (nikotink, miristik, palmitik ve stearik), karotenoidleri, kolin, pektin, hidrokarbonları ve uzun zincirli alkollerini içermektedir (DerMarderosian ve Beutler, 2002).

1.2.2. Obezite ve insülin direnci

1.2.2.1. Obezite

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tanımlamasına göre obezite, sağlığı bozacak ölçüde vücutta anormal veya aşırı yağ birikmesidir. DSÖ'ye göre obeziteyi ölçmede genellikle beden kitle indeksi (BKİ) ele alınmaktadır. BKİ, kişinin vücut ağırlığının (kg) kişinin boyunun karesine (m) bölünmesiyle elde edilmektedir. Beden kitle indeksi kişinin yağ dağılımı hakkında fikir vermeyen boy kilo oranına göre obezite hakkında yorum yapabilmeyi sağlayan bir yöntemdir. DSÖ'ye göre BKİ ≥ 25 şişman, BKİ ≥ 30 1.derece obez, BKİ ≥ 35 2.derece obez ve BKİ ≥ 40 3.derece obez sayılmaktadır. Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü obeziteyi belirlemede başka bir yöntem olarak bel çevresinin kalça çevresine oranını kullanmakta; oranı 0,85'ten büyük kadınlar ve 1'den büyük erkekler obez sayılmaktadır.

Düzensiz ve yanlış beslenme alışkanlığı, yetersiz fiziksel aktivite, hormonal ve metabolik etmenler, sosyokültürel çevre, psikolojik etmenler, genetik yatkınlık, kullanılan bazı ilaçlar, doğum sayısı ve yapılan doğumlar arasındaki süre obeziteyi etkileyen risk faktörlerindedir (Türkiye Obezite ile Mücadele ve Kontrol Programı, 2010).

Dünya Sağlık Örgütüne göre obezite tüm yaş gruplarını kapsayan ve görülme sıklığı sürekli artan bir hastalıktır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yetişkin erkeklerin %35'inden fazlası, yetişkin kadınların %40'ı ve çocuk ve ergenlerin %17'si obezdır. Avrupa'da ise obez olma durumu yetişkin erkeklerde %32-79, yetişkin kadınlarda ise %28-78 arasında değişmektedir (Vehapoğlu vd., 2015). Türkiye'de ulusal obezite düzeyini ortaya koyan bir çalışma olmamakla birlikte, obezite oranlarının son 12 yılda, kadınlarda %34 erkeklerde %10,7 artış gösterdiği saptanmıştır (Vehapoğlu vd., 2015).

Obezite yaşam kalitesini azaltarak ve neredeyse tüm vücut sistemlerini etkileyerek farklı sağlık sorunlarına sebebiyet veren bir hastalıktır (Türkiye Obezite ile Mücadele ve Kontrol Programı, 2010). Obezite ile korelasyon gösteren başlıca sağlık sorunları

arasında insülin direnci, Tip II diyabet, hipertansiyon, ateroskleroz, hiperlipidemi, hipertrigliseridemi ve metabolik sendrom sayılmaktadır (Türkiye Obezite ile Mücadele ve Kontrol Programı, 2010).

Obezite, prevalansı yetişkin ve çocuk popülasyonlarında git gide dramatik şekilde artan ve farklı komplikasyonlara sebep olan bir hastalıktır (Ng vd. 2014; Koren vd. 2018). Obezite yağ dokusunun hacimce büyümesiyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu büyüme adiposit hücrelerinin sayısının artması ve/veya boyutunun büyümesini kapsayabilmektedir (Hatano vd. 2014).

Obezite, adipoz dokunun insülin duyarlılığını etkileyebilen adipokinler olarak adlandırılan proteinleri salgılaması nedeniyle, Tip-II diyabetin gelişmesi için bir risk faktörüdür. Yağ dokusu, özellikle de visceral kompartman, artık insülin direnci sendromuna birincil katkı olarak kabul edilmektedir. Sitokinler, kemokinler ve serbest yağ asitleri dahil olmak üzere adipoz dokudan salgılanan birkaç faktör, glukoz homeostazı ve lipit metabolizmasını etkileyen insülin sinyalinin bozabilir. Buna göre, obezite şu anda kronik bir düşük yoğunluklu inflamasyon durumu olarak kabul edilmektedir (Arner,2003). Bu bağlamda yapılan çalışmalarda, adipoz dokudan salgılanan inflamatuvar ajanların obezitenin moleküler arka planını anlamada kilit rol oynadığı düşünülmektedir. Örneğin TNF- α adiposite ve insülin direnci gelişimi arasında bir bağlantı olarak düşünülmüştür çünkü yapılan çalışmalarda Tip-II diyabetli deneklerin büyük bir çoğunluğu obezdir ve TNF- α obez deneklerde yüksek oranda eksprese edilmektedir (Hotamisligil,2003; Nieto-Vazquez vd., 2008). RBP4, leptin ve IL-6 gibi birçok adipoz dokudan salgılanan faktör, obez insanlarda ve kemirgenlerde yağ dokusunda yükselmektedir (Nieto-Vazquez vd.,2008).

1.2.2.2. İnsülin direnci

İnsülin direnci sabit insülin miktarına karşı beklenenden düşük yanıt olarak tanımlanır (Hotamisligil,1999). Yaşlanma, polikistik yumurtalık hastalığı, metabolik sendrom, kanser, enfeksiyonlar, travma ve en belirgin şekilde obezite ve Tip-II diyabet gibi birçok hastalıkla ilişkilidir (Olefsky vd.1990; Moller vd. 1994).

Pankreasta bulunan langerhans adacıklarının beta hücreleri tarafından üretilen insülin kanda bulunan glukozun düşmesini sağlar. Glukozu kas ve karaciğer gibi dokulara taşır ve burada glikojen olarak depolanmasında görev yapar. Karaciğerde glikojenin yıkılıp glukoz oluşturmasını engelleyerek hepatik glukoz salınımını önler (Altınova vd. 2007). İnsülinin kandaki glukozu düşürücü ve hepatik glukoz salınımını önleyici etkisi Tip-II diyabette bozulmuştur (Mitrakou vd. 1992) Yapılan çalışmalar, insülin direnci olan bireylerde saptanan beta hücrelerindeki fonksiyon bozukluklarının ya da harabiyetin diyabetle ilişkisi olduğunu düşündürmektedir (Shuman vd. 1988; Aslan vd. 2005, Huysal vd. 1999).

İnsülin, iskelet kası, yağ ve kalp gibi insüline duyarlı dokularda glikoz alımını indükleyerek kan glukozunu azaltır. İnsülin ayrıca kan glikozunun kontrolünde karaciğer, böbrek ve ince bağırsakta glukoz üretimini de inhibe eder. Ayrıca, insülin yağ asitleri ve glikojen sentezini uyarır, mitokondriyal fonksiyonu destekler, mikro dolaşımı artırır ve hücre çoğalmasını indükler (Ye, 2007; He vd., 2011). İnsülin direnci, insüline karşı duyarlı olmayan dokuların yanıtındaki azalmayla olduğunda ortaya çıkar (Ye, 2013). İnsulin direncinin şu karakteristik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Ye, 2013):

- a. Açlık durumunda hiperinsulinemi ve hiperglisemi
- b. Yemek sonrası hiperglisemi
- c. Hiperlipidemi
- d. Bozulmuş glukoz toleransı
- e. Bozulmuş insülin toleransı
- f. Azalmış glukoz infüzyon hızı
- g. Artmış hepatik glukoz miktarı

- h. Hipoadiponektinomi
- i. Plazmadaki artmış inflamatuvar belirteçler (TNF- α , IL-6 gibi).

İnsülin direnci, insüline duyarlı glukoz alımının insüline duyarlı dokularda bozulduğu bir durumdur. Bu bozukluk, insülin sinyal yolunun inhibisyonunun bir sonucudur. Kan glukozunu kontrol etmek için beta adacıkları yüksek miktarda insülin ürettiği için insülin direncinin hiperinsülinemiye yol açtığı düşünülmektedir (Ye ,2013).

Hiperglisemi ve hipoinsulinemi sergileyen Tip-I diyabetin aksine, Tip-II diyabet genellikle hiperglisemi ve hiperinsülinemi gösterir. İnsülin direnci tip-II diyabetin birincil nedenidir (Nieto-Vazquez vd. 2008). Obezite, enflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, hiperlipidemi, hiperinsülinemi, genetik arkaplan, hamilelik, yaşlanma gibi risk faktörleri insülin direncini etkilemektedir (Ye, 2013).

1.2.3. Moleküler markörler olarak seçtiğimiz gen bölgeleriyle ilgili bilgiler

Moleküler markörler çalışılan organizmada ilgilenilen özelliğin genetiği hakkında bilgi veren DNA dizileridir. İnsülin direnci ve obeziteyle ilişkili seçtiğimiz gen bölgelerinin transkripsiyonel regülasyonuna bağlı olarak diferensiyel edilmiş 3T3-L1 hücrelerinde *Hypericum perforatum*'un obezite ve insulin direncine olan etkisi araştırılmıştır. Çalışmada TNF- α , IL-6, PPAR- γ , Col V, Elastin, FAS, DGAT, LPL ve housekeeping gen olarak da elde edilen transkripsiyon verilerini normalize etmek amacıyla 18S kullanılmıştır.

- a. **IL-6 (Interlokin-6):** Yağ dokusundan salgılanan bir sitokinidir (Mohamed-Ali vd.,1997). Yapılan çalışmalarda obezite ve diyabete sahip hastalarda IL-6'nın ekspresyonunda görülen artış insülin direnci ve obezite ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Mohamed-Ali vd., 1997; Bastard vd.,2000). IL-6'nın obeziteyi ne tür bir mekanizma ile etkilediği bilinmese de obeziteyle ilişkisinin adipoz dokulardan sentezlenmesi ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Kern vd., (2001), IL-6'nın insülin direnciyle anlamlı pozitif bir korelasyonu olduğunu obezite ile de ilişkili olduğu ifade etmişlerdir.

Ayrıca BKİ'nin yüksek olmasıyla plazmadaki IL-6 miktarının konsantrasyonu arasında pozitif korelasyonun varlığı yapılan çalışmalarla gözlemlenmiştir (Bastard vd.,2000; Kern vd., 2001; Yudkin vd.,1999). IL-6, TNF- α ve IL-1'in salgılanmasıyla ortaya çıkar ve IL-6 ile birlikte plazmada yağ asidi miktarı ve yağ oksidasyonu artarken yağ dokudaki LPL'in aktivitesinin azalması gözlemlenmiştir (Greenberg vd.,1992; Stouthard vd.,1995). Ayrıca hepatik glukozu ve glisemiye arttırması insülin duyarlılığına ters bir şekilde çalıştığını göstermektedir (Stouthard vd., 1995; Kanemaki vd., 1998).

- b. **TNF- α (Tumor necrosis factor):** Obezitede yağ dokunun insülin duyarlılığını etkileyen sitokinler salgıladığı bilinmektedir. Bu sitokinlerden biri olan TNF- α 'nın yağlanma ve insülin direnci arasında bir bağlantı olduğu düşünülmektedir. Hotamisligil'in yaptığı çalışmada obezite ve insülin direncine sahip deneklerde kontrol grubuna göre TNF- α 'nın mRNA ve protein seviyelerinin önemli ölçüde yüksek olduğu ortaya konulmuştur (Hotamisligil, 2000). Yapılan çalışmalarda TNF- α 'nın kandaki serbest yağ asidi miktarını arttırdığı ve lipitleri yağ asidi ve gliserol şeklinde parçalayan LPL'in inhibisyonunu sağladığı gözlemlenmiştir (Nieto-Vazquez vd., 2008).
- c. **LPL (Lipoprotein lipase):** Lipoprotein lipaz, lipitlerin metabolizmasında ve taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır. Şilomikron ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerde (VLDL'ler) çekirdek trigliseridlerin (TG) hidrolizinden sorumlu olan enzimdir, ki bu da şilomikron kalıntıları ve ara yoğunluklu lipoproteinleri (IDL'ler) üretir. LPL'nin, lipoproteinler arasındaki lipit değişimini teşvik ettiği ve plazma lipoprotein partiküllerinin çoğunun kinetiğinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Goldberg vd.,2001; Eckel 1989). Lipoprotein lipaz, adiposit içindeki yağ olarak daha sonra depolanması için dolaşımdaki trigliseritleri yağ asitlerine hidrolize ederek adiposit metabolizmasında önemli bir etki göstermektedir. Dolayısıyla, LPL'nin aktivitesindeki bir azalma, toplam vücut yağ depolarındaki azalmaya katkıda bulunmaktadır (Greenberg vd., 1992). TNF- α ve IL-6, LPL'in aktivitesini azaltmaktadır, TNF- α 'nın bunu LPL'in gen transkripsiyon hızını yavaşlatarak yaptığı bilinmektedir (Zechner vd.,1988; Fried vd., 1989 Cornelius vd., 1988).

Yağ dokusunda LPL insülinle ve yemek yemekle artmakta, ancak açlık durumunda azalma göstermektedir. İnsanlarda ve kemirgenlerde yapılan çalışmalarda görülmüştür ki obezitede, yağ dokusunda hücre başına düşen LPL miktarı artmaktadır. Bununla birlikte, obezitede LPL'nin insüline ve beslenmeye verdiği cevap azalır (Hartman, 1981; Sadur vd., 1984; Terretaz, 1994; Wang vd., 2009).

- d. **FAS (Fatty acid synthase):** Yağ asidi sentetaz olarak bilinmektedir. FAS, asetil-CoA öncülerinden uzun zincirli yağ asitlerinin biyosentezini katalize eden anahtar lipojenik bir enzimdir (Boizard vd., 1998). Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde bu enzimin arttığı gözlemlenmiştir. Adipositeyle pozitif korelasyon içindedir ve obezite durumunda FAS'de artış gözlemlenmektedir (Kim vd.,2016)
- e. **PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ):** PPAR- γ , adipoz farklılaşmasında, lipit depolamasında ve glikoz homeostazında önemli bir rol oynayan adipoz dokusunda baskın olarak ifade edilen bir transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir (Rosen vd., 2000; Schoonjans vd. 1996). PPAR- γ , FAS, aP2 ve lipoprotein lipaz dahil, adipoz doku lipogeneziyle ilişkili enzimlerin gen ekspresyonunu düzenlemektedir (Kliwer vd., 1998, Kim vd., 2016) Adipositler glikoz ve lipit metabolizmasında düzenleyici olarak görev yapan sitokinleri salgılamaktadır. Bu sitokinlerden biri adiponektindir ve anti-inflamatuvar ajan olarak görev yapmaktadır. PPAR- γ adiponektinin gen transkripsiyonunu arttırdığı bilinmektedir. Şöyle ki PPAR- γ adiponektinin promotöründeki PPAR- γ duyarlı elemana bağlanarak, adiponektin gen transkripsiyonunu arttırmaktadır (Hatano vd.,2014).
- f. **DGAT (Diacylglycerol-O-acyltransferase):** Trigliseritler çoğu canlı organizmada metabolik enerjinin ve yağ asitlerinin ana depolama molekülleridir. Ancak, trigliseritlerin aşırı birikimi obezite ve diabetes mellitus gibi hastalıklarla ilişkilidir. Trigliseritlerin biyosentezi DGAT enzimleri tarafından katalize edilir. Harris ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada DGAT'in varlığının lipit damlacıkları ve trigliserit oluşumunda önemli rol oynadığı, trigliserit oluşumu ancak iki DGAT enzimi (DGAT1 ve DGAT2) varlığında gerçekleşebildiği gösterilmiştir (Harris vd., 2011).

Obezite, aşırı trigliseritin beyaz adipoz dokularda depolanması ile karakterize edilmektedir ve sıklıkla iskelet kası ve karaciğeri gibi dokularda trigliseritin anormal depolanması ile birlikte görülmektedir. DGAT'in overekspresyonu trigliserit akümülyasyonunu arttıracığından DGAT artışı obezite ile pozitif korelyasyona sahiptir (Yen vd., 2008).

- g. **Kolojen V ve Elastin:** Ekstraselüler matriksten salgılanan iki bileşendir. Yapılan çalışmada obezite ve buna bağılı insülin direncinin adipoz dokudaki sertlikle alakalı olduğı düşünölmüş ve bunun için hücrenin elastikiyetiyle alakalı kolojen V ve elastin markörleri göz önünde bulundurulmuştur. Spencer ve ark (2010) yaptıkları çalışmada obez ve zayıf kişiler arasında elastin proteininde fark olduğı gözlemlenmiştir. Elastin proteini zayıf kişilerde bol miktarda bulunurken obez bireylerde düşük olduğı ayrıca elastin fibrillerinin zayıf kişilerde olduğı kadar lifli olmadığı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada elastinin insülin duyarlılığı ile anlamlı ilişkisi olduğı görölmüştür. Kolojen V büyük kan damarlarında bol miktarda bulunmuştur. Yağ dokunun elastikiyetini azaltıcı etkiye sahip olan kolojen V yapılan çalışmada daha çok obez bireylerde gözlemlenmiştir.
- h. **18S:** Moleküler biyolojide, housekeeping genler tipik olarak temel hücresel fonksiyonun korunması için gerekli olan ve normal ve patofizyolojik koşullar altında bir organizmanın tüm hücrelerinde eksprese edilen yapısal genlerdir. Yani her hücrede ve miktar olarak fazla eksprese edilirler. 18S bu çalışmada kullanılan housekeeping gendir. Alınan ekspresyon verilerinin eşit miktarda RNA kullanılarak gerçekleştirildiğini göstermesi ve verilerin 18S ekspresyonuna oranlanıp normalize edilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki materyali

Hypericum perforatum L. bitkisi Muğla yöresinin dağlarından toplanarak Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Emekli Öğretim Üyesi Prof. Dr. Güven Görk ve Öğr. Gör. Dr. Olcay Ceylan tarafından Davis (1965-1985)'e göre teşhis edilmiştir. Bitkilerin karanlık, serin ve rutubetsiz bir ortamda yaklaşık 15-20 günde açık havada kurutulması sağlanmıştır. Kurutulan bitkiler içerisinde fotoreaktif bileşenler ihtiva ettiğinden karanlıkta saklanmaya devam edilmiştir.

2.1.2. Hücre hattı

3T3-L1 hücre hattı, ATCC firmasından satın alınmıştır (CL-173). 3T3-L1 hücre hattı fibroblastik morfolojiye ve preadiposit yapıya sahiptir. 3T3-L1 hücre hattı preadiposit yapısından dolayı belirli kimyasallarla stimüle edildiğinde adipositlere dönüştüğünden, araştırmacılar tarafından obezite ve obeziteye bağlı metabolik hastalıkların çalışılmasında sıklıkla kullanılmaktadır.

Hücre hattı *Mus musculus*'un embriyonik dokularından elde edilmiştir. Hücre hattı sıvı azot ya da -80 °C'de saklanır.

3T3-L1 adherent özelliğe sahip bir hücre hattıdır. Hücreler kültür kabının alt yüzeyine tutunur ve burada tabaka oluştururlar. Oluşan bu tabakanın tek tabaka (mono layer) olmasına özen gösterilmelidir. Hücre hatları immortal özelliğe sahip olduğundan, hücreler zamanı geldiğinde pasajlanmazsa hücrelerin birbiriyle teması arttıkça monolayer durum polilayer duruma dönüşecektir. Bunun sonucunda adherent olan hücreler yüzeyden uzaklaşacak ve tabakada açılmalar olacaktır.

Hücreler preadiposit yapıdayken %10 Newborn Calf Serum (FCS) (Capricorn Scientific, NCS-1B) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) (Multicell,450-201-EL) içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (L0102-500) besin ortamında kültüre alınmıştır. Bu kültür ortamı tarafımızca Growth Medium (GM) olarak adlandırılmıştır.

Hücrelerin preadiposit yapıdan adiposit yapıya dönüştürülmesinde iki tane kültür ortamı kullanılmıştır. İkisi de %10 Fetal Calf Serum (Capricorn Scientific, FBS-12B) ve %1 Pen-Strep içeren DMEM besin ortamında hazırlanmıştır. Bu besin ortamı bizim tarafımızdan Differentiation Medium (DM) olarak adlandırılmıştır. Bu besin ortamlarından ilki DM'e ek olarak 1.0 µM Deksetazon (Sigma, BCBV5460), 0.5 mM isobütilmetilksantin (IBMX) (Sigma, STBF6061V) ve 1.0 µg/mL insülin (Sigma, SLBV1793) içermektedir. Bu besin ortamıyla hücreler 48 saat muamele edilmiştir. İkinci besin ortamı DM'e ek olarak 1.0 µg/mL insülin içermektedir ve hücreler bu ortamla yaklaşık 12 gün her iki günde bir ortam tazelenerek muamele edilmiştir. Yaklaşık 2 hafta sonunda hücrelerin adiposite dönüşümü gözlemlenmiştir.

2.1.3. Kimyasal materyal

Çalışma boyunca hücrelerden total RNA izolasyonu yapmak için RiboEx™ (301-001) kullanılmıştır. Elde edilen RNA'lar çift iplikli cDNA'lara dönüştürülmüştür, cDNA'ya dönüştürmek için EasyScript Plus cDNA synthesis kit (abm, G236) kullanılmıştır. cDNA örnekleriyle ilk olarak primerlerin sentezinin doğru bir şekilde gerçekleştiğini gözlemlenmek üzere PCR reaksiyonu kurulmuştur. Taq DNA Polymerase (abm, G008) ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örneklerinden primerlerin bağıl mRNA ekspresyonunu ölçmek için kantitatif PCR (qPCR) reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. qPCR reaksiyonunu gerçekleştirmek için Real Q Plus 2X Master Mix (Ampliqon, A323402) kullanılmıştır.

2.1.4. Primerler

Primerler NCBI üzerinden tasarlanmıştır. *Mus musculus* (fare) için tasarlanan sekiz farklı primer lipid akümülayonuyla ilintili olanlar, inflamasyonla ilintili olanlar, ekstraselüler matriks bileşenleri ile ilintili olanlar, insülin duyarlılığıyla ilintili olanlar ve housekeeping gen olmak üzere 5 grupta sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmalara ait olan primerlerin dizileri aşağıda verildiği gibidir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Primerlerin sınıflandırılması

Lipid Akümülayonu ile ilintili markörler	Fare DGAT1; (Diacylglycerol transferase)	(F): 5'- CCTCAGCCTTCTCCATGAG- 3' (R): 5'- ACTGGGGCATCGTAGTTGAG- 3'
	Fare LPL; (Lipoprotein lipase)	(F): 5'-ACTCGCTCTCAGATGCCCTA- 3' (R): 5'-TTGTGTTGCTTGCCATTCTC- 3'
	Fare Fas; (Fatty acid synthase)	(F): 5'- CTGAGATCCCAGCACTTCTTGA- 3' (R): 5'- GCCTCCGAAGCCAAATGAG- 3'
Enflamasyon ile ilintili markörler	Fare TNF-α; (Tumor necrosis factor-alpha)	(F): 5'- CCCCAAAGGGATGAGAAGTT- 3' (R): 5'- CTCCTCCACTTGGTGGTTTG- 3'
	Fare IL-6	(F): 5'- GTTCTCTGGGAAATCGTGGA - 3' (R): 5'- TCCAGTTTGGTAGCATCCATC - 3'

Çizelge 1.1. Primerlerin sınıflandırılması (devamı)

Ekstraselüler Matriks (ECM) Komponentleri ile ilintili markörler	Fare Kolajen V	(F): 5' - CTCAGGGGTAACGAAAACCA - 3' (R): 5' - GGAGAAGTCCTCGGGAAAAC - 3'
	Fare Elastin	(F): 5' - TTATCCAGGGGCTGGTATTTG - 3' (R): 5' - TCCAAACGTCCCAGAAGTC - 3'
İnsulin duyarlılığı ilintili Markörler	Fare Peroksizom Proliferator Activated Receptor- gamma(PPAR- γ)	(F): 5' - CTGTGAGACCAACAGCCTGA - 3' (R): 5' - CAGTGGTTCACCGCTTCTTT - 3'
Housekeeping geni	18S	(F): 5' - TTCGAACGTCTGCCCTATCAA - 3' (R): 5' - TAGGTAGGCACGGCGACTA - 3'

2.2. Metot

2.2.1. Bitki ekstraktının hazırlanması

Hypericum perforatum L. doğadan toplandıktan sonra serin ve karanlık bir ortamda kurutulmuştur. Kurutulmuş bitki materyalinin toprak üstü kısımları doğrayıcı vasıtasıyla parçalanmıştır. Öğütülen materyalin tartımı yapılmış ve tartılan miktarın 10 katı kadar etanol ve metanol çözücüleri eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 7 gün bekletilmiştir. 7 günün sonunda Watmann kağıdıyla bitkinin büyük parçalarının uzaklaştırılması ve kimyasal bileşenleri içeren süzütünün oluşturulması sağlanmıştır. Süzüntüdeki çözücülerin uzaklaştırılması için evaporatör kullanılmıştır. Evaporatör 40°C'de ve düşük basınçta çalıştırılarak metanol ve etanolün buharlaşması

sağlanmıştır (Şekil 2.1.). Elde edilen ekstraktlar alüminyum folyoya sarılarak karanlıkta ve 4°C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 2.1. Ekstraktların içinde çözündüğü alkolün uzaklaştırılması

Hazırlanan ekstraktlar hücre kültüründe kullanılacağı zaman ihtiyaç duyulan konsantrasyona göre tartılıp metanol ve etanol çözücülerinde çözüldükten sonra 0.2 mm filtreden şırınga yardımıyla geçirilerek besin ortamı içine aktarılmıştır.

2.2.2. Hücre kültürü çalışması

Çalışmada satın alınan *Mus musculus* embriyonik fibroblast 3T3-L1 preadiposit hücreleri kullanılmıştır (Şekil 2.2). Hücrelerinin büyüme ve gelişmelerini sürdürebilmeleri için besin ortamı olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), %10 FCS (Newborn Calf Serum) ve %1 Penisilin-Streptomisin kullanılmıştır. Hücrelerin preadiposit yapıdan adiposit yapıya dönüştürülmesinde ise DMEM, %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 Penisilin-Streptomisin kullanılmıştır.

DMEM, aminoasit, vitamin ve yüksek oranda şeker içermesinden dolayı hücrelerin gerekli besin ihtiyacını karşılamaktadır. FCS ve FBS hücre kültür çalışmalarında hücrelerin çoğalması için kullanılan zengin protein çözeltilisidir. İçerisinde hücreler için gerekli olan hormonları, enzimleri, büyüme faktörlerini ve hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlayan matris proteinlerini barındırır. Birer antibiyotik olan Penisilin ve Streptomisin hücre kültüründe gram-pozitif ve gram-negatif bakteri kontaminasyonunu önlemek amacıyla kullanılmaktadır.

Hücreler CO₂ seviyesi %5 olan CO₂ inkübatöründe 37°C'de muhafaza edilir.



Şekil 2.2. Ticari olarak satın alınan 3T3-L1 hücre hattı

2.2.2.1. Hücrelerin çözülmesi

3T3-L1 hücre hattının kriovial içerisinde -80°C 'lik buzdolabında ya da -196°C 'de sıvı nitrojende depolanması gerekmektedir. Yeni satın alındığında soğuk zincirde gelen veya önceden dondurulmuş olan hücreler öncelikle çözme işlemine tabii tutulmuştur. Hücreler çözülürken:

1. Gerekli miktarda önceden ısıtılmış büyüme ortamı (GM) 15 mililitrelik falcon tüpüne konulmuştur.
2. Oda sıcaklığında çözülmesi sağlanan hücrelerin GM ile serolojik pipet vasıtasıyla karıştırılması sağlanmıştır.
3. Hücreler ve GM'yi içeren karışım hücre kültür kabına aktarılmıştır.
4. Hücre kültür kabının CO_2 inkübatörüne kaldırılmıştır.

2.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması

Bu çalışmada pasajlama yaparken aşağıda verilen adımlar takip edilmiştir. Verilen sayısal değerler 6 cm²'lik petri kabı içindir.

1. Hücrelerin içinde bulunduğu büyüme ortamı serolojik pipet aracılığıyla uzaklaştırılmıştır.
2. Hücrelerin 3 ml PBS ile 2 kez yıkanması sağlanmıştır. PBS bir tampon çözeltilidir. Hücrelerin büyüme ortamında bulunan FCS'i uzaklaştırarak tripsin enziminin aktivitesini artırır. Tripsinizasyon basamağı için ön hazırlıktır.
3. Hücreler 1 ml tripsin ile muamele edilmiştir. Tripsin hücre yüzey proteinlerini kırarak hücrelerin yüzeyden uzaklaşmasını sağlamaktadır. Bu basamakta hücreler 4 dakika CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir. Yüzeyde görünür hale gelen hücrelerin mekanik etki yardımıyla yüzeyden ayrılması sağlanmıştır.
4. Mikroskop altında yüzeyden ayrıldığı ve bulutumsu bir yapı gösterdiği gözlemlenen hücrelerin tripsin miktarının en az 2 katı kadar hacimde büyüme ortamıyla yıkanması sağlanmıştır.
5. Hücreler serolojik pipet vasıtasıyla petri kabından 15 ml'lik falcon tüpüne alınmıştır.
6. 1200 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Bu adımda hücreler toplanmıştır.
7. Supernatant kısmı serolojik pipet vasıtasıyla atılmıştır. Hücre pelleti 1/4 pasajlama için 4 ml'de çözülür.
8. Hücreler çözülürken pelletin partiküllü halde kalmamasına ve homojenizasyonuna dikkat edilmelidir.
9. 4 adet 6 cm² petri kaplarına her birine 3 ml olacak şekilde önceden ısıtılmış büyüme ortamları ilave edilmiştir.
10. Hücre ve büyüme ortamı karışımı her bir petri kabına 1 ml olacak şekilde aktarılmıştır.
11. Petri kabı dikey ve yatay şekilde sallanarak hücrelerin tüm kültür kabında eşit dağılması sağlanmıştır.

12. Hücreleri içeren petri kapları CO₂ inkübatörüne kaldırılmıştır.

2.2.2.3.Hücrelerin dondurulması ve saklanması

Hücreler yapılan çalışma için gerektiğinden daha fazla çoğalıyorsa bu fazla hücreler dondurularak ileriki çalışmalar için saklanabilir (Davis vd., 2002).

Hücreler dondurulurken pasajlama prosedürü 6. basamağın sonuna kadar takip edilmiştir. Daha sonra her bir kriyovial için GM:DMSO 9:1 oranında kullanılmıştır. Örneğin 1 kriyovial oluşturmak için $900 \mu\text{l} \times 1 = 900 \mu\text{l}$ GM ve hücre karışımı ve $100 \mu\text{l}$ DMSO kullanılmıştır. 1 kriyovial için toplamda 1 ml kullanılmasının sebebi kullanılan kriyoviallerin hacminin 1,5 ml olmasıdır. Bununla donma sonucunda hacimdeki artma ile kriyoviallerdeki hücelere zarar gelmesi engellenmek istenmiştir. DMSO hücrelerdeki suyu çekerek donma ve çözülmelerde hücrelerin ozmotik basınçtan dolayı zarar görmesini engellemek amacıyla kullanılan bir kimyasaldır.

Hücreler önce GM içinde çözülmüştür daha sonra gerekli miktarda DMSO eklenip kriyoviallere aktarılmıştır. DMSO eklendikten sonra karışımın sert bir şekilde pipetlenmemesi nazik olunması gerekmektedir.

Kriyoviallere aktarılan hücelere hızlı bir şekilde -80°C 'ye kaldırılır.

2.2.2.4. Hücrelerin diferensiyasyonu

Diferensiyasyonu gerçekleştirmek üzere hücre hattının satın alınmış olduğu ATCC firmasının diferensiyasyon protokolü uygulanmıştır (Web-2).

Diferensiyasyon protokolü

1. İlk olarak hücreler ekilmiş oldukları kaplarda yaklaşık %70 confluency'e getirilmelidirler. Diferensiyasyon uygulaması başladığında hücreler büyüme ve gelişmesini sürdüreceğinden %100 confluency'e sahip olmaları hücrelerin ömrünü azaltacak ve diferensiyasyon uygulamasının başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olabilecektir.
2. Yaklaşık %70 confluent olan hücrelere ilk olarak prediferensiyasyon ortamı uygulanır. Bu ortam DM içinde hazırlanır. DM %1 Penisilin-Streptomisin, %5 Fetal Bovine Serum (FBS) %94 DMEM içerir. Prediferensiyasyon ortamı için:
1.0 µM Deksametazon
0.5 mM isobütilmetilksantin (IBMX)
1.0 µg/mL insülin kullanılmıştır.
Bu ortam içerisinde hücreler 48 saat bekletilmiştir.
3. 24-well plate'den prediferensiyasyon ortamı 48 saat sonunda tamamen uzaklaştırılmıştır. Aynı hacimde diferensiyasyon ortamı eklenmiştir. Diferensiyasyon ortamı DM içinde 1.0 µg/mL insülin içerir.
4. Diferensiyasyon ortamı her 48-72 saatte bir değiştirilmiştir.
5. Hücreler diferensiyeye olmaya başladıklarında lipit damlacıkları görünür hale gelmiştir.
6. Yaklaşık 7-15 gün sonunda hücreler diferensiyeye olmuştur.

2.2.2.5. Diferensiyel edilen 3T3-L1 hücrelerinin Oil Red O ile boyanması

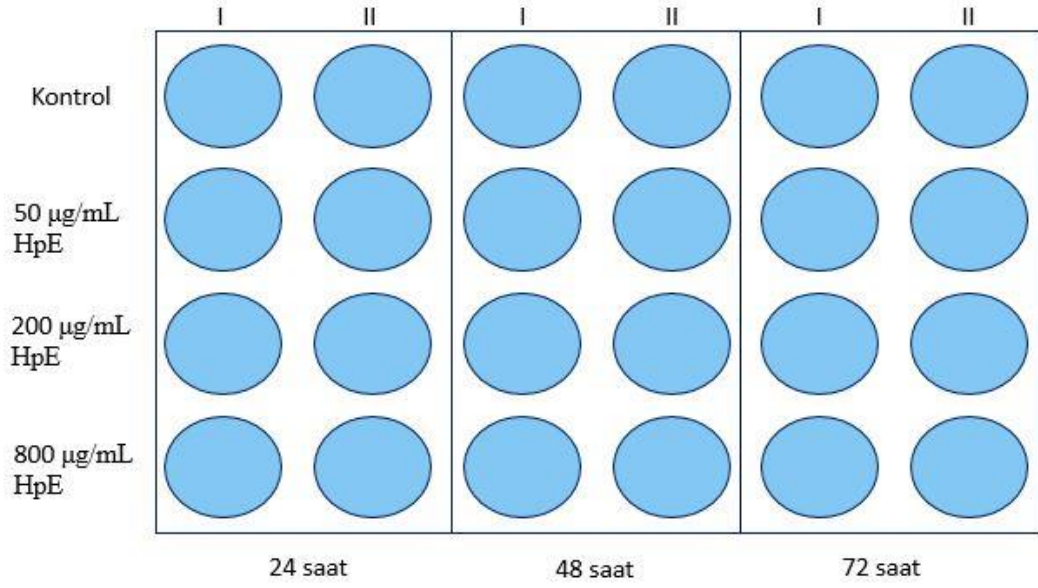
Tüm bileşenler 24-well plate için 500 µl/well; 6 cm²'lik petri kabı için 4 ml kullanılmıştır.

1. Hücrelerin içinde bulunduğu ortam uzaklaştırılmıştır, hücrelerin 2 kez PBS ile yıkanması sağlanmıştır.
2. PBS uzaklaştırılmıştır ve hücreler %10'luk formalin ile 30-60 dakika inkübe edilmesi sağlanmıştır. Formalin hücrelerin fiksasyonu için kullanılmaktadır. Bu aşamada direkt olarak hücrelerin üzerine pipetleme yapılmamalıdır. Formalinle muamele sonrası inkübasyon homojen karışma sağlanması için karıştırıcıda yapılmıştır.
3. %60'luk izopropanol kültür kaplarına eklenip 5 dakika inkübe edilmiştir.
4. Oil Red O çalışma solüsyonu kullanmadan 15 dakika önce hazırlanır. 2X dH₂O ve 3X Oil Red O Stok Solüsyonu iyice karıştırılmıştır ve 10 dakika bekletilmiştir. 0.2 µm şırınga filtresi ile filtreden geçirilerek kullanılmıştır.
5. İzopropanol uzaklaştırılmıştır ve Oil Red O çalışma solüsyonu ile hücreler muamele edilmiştir.
6. Hücrelerin inkübasyonu 10-20 dakika boyunca karıştırıcıda yapılmıştır.
7. Boya uzaklaştırılmıştır ve 2-5 kere boya görünmeyene kadar dH₂O ile yıkama gerçekleştirilmiştir.
8. Hematoksilin eklenmiştir ve 1 dakika inkübe edilmiştir. Hematoksilin daha sonra uzaklaştırılmıştır ve ihtiyaca göre 2-5 kere dH₂O ile yıkanmıştır.
9. Mikroskop altında gözlem yaparken hücreler dH₂O ile kaplı tutulmuştur. Lipit damlacıkları kırmızı ve çekirdekleri mavi-mor renkte görülmüştür.

2.2.3. 3T3-L1 hücre hattına *Hypericum perforatum* L. ekstraktı konsantrasyon deneme çalışmaları

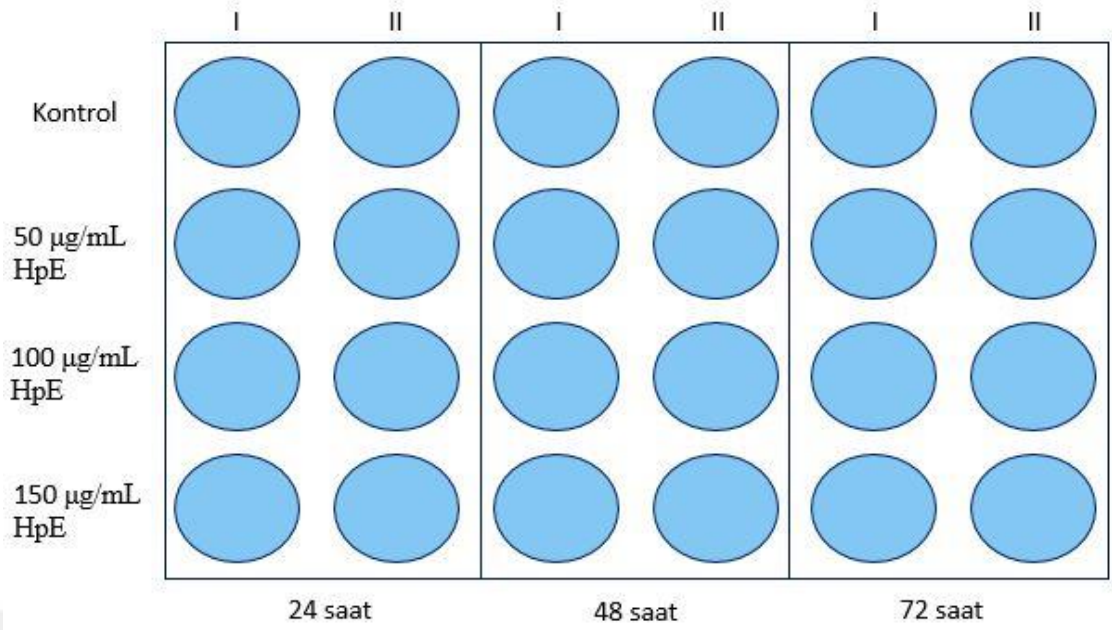
Hypericum perforatum ekstraktının 3T3-L1 hücrelerine etkisini gözlemek üzere 24-well plate’de doza ve zamana bağımlı deney düzeneği kurulmuştur. 24 saat, 48 saat ve 72 saat olmak üzere 3 zaman dilimi kullanılmıştır ve 50 µg/ml, 200 µg/ml, 800 µg/ml olmak üzere 3 doz ve kontrol grubuyla deney kurulmuştur (Şekil 2.3).

Bu deney ile bitkinin normal 3T3-L1 hücrelerinde canlılığa etkisini ve toksisiteni ölçmek amaçlanmıştır. Belirlenen dozlarda ekstrakt hazırlanması için ilk olarak daha önceden hazırlanmış ve +4°C’de dolapta bekletilen *Hypericum perforatum* L. ekstraktı tartılmıştır ve çözücüde (metanol) çözülmüştür 20 mg/ml olacak şekilde stok ekstrakt çözeltisi oluşturulmuştur. Önceden ısıtılmış GM içine, 50 µg/ml, 200 µg/ml ve 800 µg/ml son ekstrakt konsantrasyonuna sahip olacak şekilde stok ekstrakt çözeltisinden mikropipet yardımıyla alınmıştır. Kontrol grubuna çalışmada *Hypericum perforatum*’un ise metanolde çözülmüş ekstraktı kullanıldığı için en yüksek miktarda ekstraktın içerdiği metanol kadar metanol konulmuştur. Bu çalışma için bu miktar 200 µl’dir. Ekstraktlı GM’ler önce 72 saatlik kısımdan başlayarak duplike şekilde 24-well plate’in kuyucuklarına uygulanmıştır. Bunun için öncelikle 24 well plate’e ekilen hücrelerin confluent hale gelmesi sağlanmıştır ve sonra içinde buldukları GM uzaklaştırılarak farklı dozlarda ekstraktlara sahip büyüme ortamı eklenmiştir. 72 saat sonunda hücrelerin gözlemi yapılmış *Hypericum perforatum*’un zamana bağlı olarak artan dozlarda hücrelerin canlılığını nasıl etkilediği ortaya konulmuştur.



Şekil 2.3. Hücrelere farklı zaman aralıklarında, 50 µg/ml, 200 µg/ml ve 800 µg/ml *Hypericum perforatum* ekstraktı uygulanması

Daha sonra önceden yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak ve 200 µg/ml ve 800 µg/ml ekstrakt içeren dozların toksik etkisi düşünülerek 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 150 µg/ml ile *H.perforatum*'un etanolde çözünmüş ve metanolde çözünmüş ekstraktlarından hücre canlılığı testi yapılmıştır. Bunun için yine 24 well plate kullanılmıştır ve örnekler duplike şekilde oluşturulmuştur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Hücrelere farklı zaman aralıklarında 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 150 µg/ml ile *H.perforatum* uygulanması

2.2.4. Hücrelerden RNA izolasyonu

Normal 3T3-L1 hücrelerinden, bitki uygulanmış 3T3-L1 hücrelerinden ve diferensiyel edilmiş 3T3-L1 adipositlerinden RiboEx yardımıyla RNA izolasyonu yapılmıştır. RiboEx™'le RNA ekstraksiyonu protokolü aşağıda verildiği gibidir (Web-3).

1. 1 ml RiboEx ile hücreler homojenize edilmiştir (1V).
2. Homojenat 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (Homojenize edilmiş örnekler -70°C'de en az bir ay bekletilebilir).
3. 0,2 ml kloroform eklenmiştir. (1/5 V)
4. Sert bir şekilde 15-30 saniye sallanmıştır.
5. 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
6. 12000 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Karışım renksiz üst tabaka, renkli interfase ve alt tabaka olmak üzere 3 kısma ayrılır ve renksiz üst kısım karışımın %50'sini oluşturur.
7. Supernatant (renksiz üst tabaka) interfaz ve alt tabakaya temas etmeden başka tüpe aktarılmıştır.

8. 0,5 ml %100'lük izopropanol karışıma eklenmiştir (0,5 V).
9. Karışım 3-5 kere aşağı yukarı ters çevirerek nazikçe karıştırılmıştır.
10. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
11. 12000 x g'de 10 dk süre ile 4°C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilmiştir.
12. Supernatant uzaklaştırılmıştır.
13. 1 ml %75 etanol ile RNA pelleti yıkanmıştır (1V).
14. 7500 x g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
15. Supernatant atılmıştır ve tüpün kapağı açık şekilde bir gece boyunca (over night) etanolün uçması için bekletilmiştir.
16. RNA, 50 µl ddH₂O'da ya da TE'de çözülür ve 10-15 dakika 56°C sıcaklıkta bekletilmiştir.
17. -20°C'de uzun süreli saklanabilir.

Hücrelerden RNA izolasyonu yapılırken ilk olarak hücrelerin içinde bulunduğu ortamın atılması sağlanmıştır. PBS ile iki kez yıkama yapılarak varsa ölü hücre ve GM ve DM kalıntıları ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 24-well plate için her kuyucuğa 500 µl, 25 cm² flask için 1 ml RiboEx'le hücreler muamele edilmiştir. RiboEx'le muamele hücrelerin parçalanmasını ve devamında RNA ekstraksiyonu ve alkolle çökeltme temeline dayanmaktadır. Protokolde kloroform ve izopropanol RNA'nın çökmesini sağlamak için kullanılmaktadır. Etanol ise RNA molekülünün pellet şeklinde çökmesini sağlamak ve tuzları uzaklaştırmak amacıyla kullanılmıştır. RNA molekülü kırılgandır ve sıcaklıktan etkilenir bu nedenle ekstraksiyon boyunca +4°C soğutmalı santrifüj kullanılmıştır.

2.2.4.1. Spektrofotometrik analiz

Spektrofotometrik analiz Thermo Scientific μ Drop aracılığıyla yapılmıştır. μ Drop 16 tane kuyucuğa sahiptir ve elde edilen RNA'lar her kuyucuğa 4 μ l olacak şekilde eklenmiştir ve kör olarak RNA'yı çözdüğümüz ddH₂O ya da TE kullanılmıştır. Kuyucuklara eklenen örnekler bilgisayar programında da aynı sırayla kaydedilmiştir, cihaz verileri bilgisayar programı aracılığıyla paylaşmaktadır. Programın içinde RNA ve DNA ölçümlerini yapmak için seçenek bulunmaktadır. Ölçüm sonucunda elde edilen 260/280 nm absorbans değerinin 2 veya 2'ye yakın olması RNA'nın saf bir şekilde elde edildiğinin göstergesidir. 260/230 değeri alkol kontaminasyonunu göstermektedir.

Konsantrasyon cDNA'ya gidilmesi açısından önemlidir.

2.2.5. RNA'dan cDNA sentezi

Bu çalışmalarda cDNA sentezi için One Script Plus Revers Transkriptaz cDNA Sentez kiti kullanılmıştır (Web-4). Bu reaksiyonu gerçekleştirmek için:

1. RNA örnekleri ve diğer tüm bileşenler buzda çözülmüştür ve her solüsyonun karışması sağlanmıştır.
2. Aşağıdaki bileşenlerle reaksiyon başlatılmıştır (Çizelge 2.1.)

Çizelge 2.1. cDNA sentezinin ilk adımında yer alan bileşenler

Bileşenler	Hacim	Final Konsantrasyonu
Total RNA (125 ng/μL)	4 μ L	500 ng/ μ L
Oligo dT (10 μM)	1 μ L	0.5 μ M
dNTPmix (10 mM)	1 μ L	500 μ M
ddH₂O	8,5 μ L	-

3. Karışım 5 dakika boyunca 65°C'ye ısıtılmıştır ve daha sonra buzda 1 dakika inkübasyonla soğutulması sağlanmıştır. Kısa santrifüjle bileşenler toplanmıştır.
4. Aşağıdaki bileşenler reaksiyon tüpüne eklenmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. cDNA sentezinin son adımında yer alan bileşenler

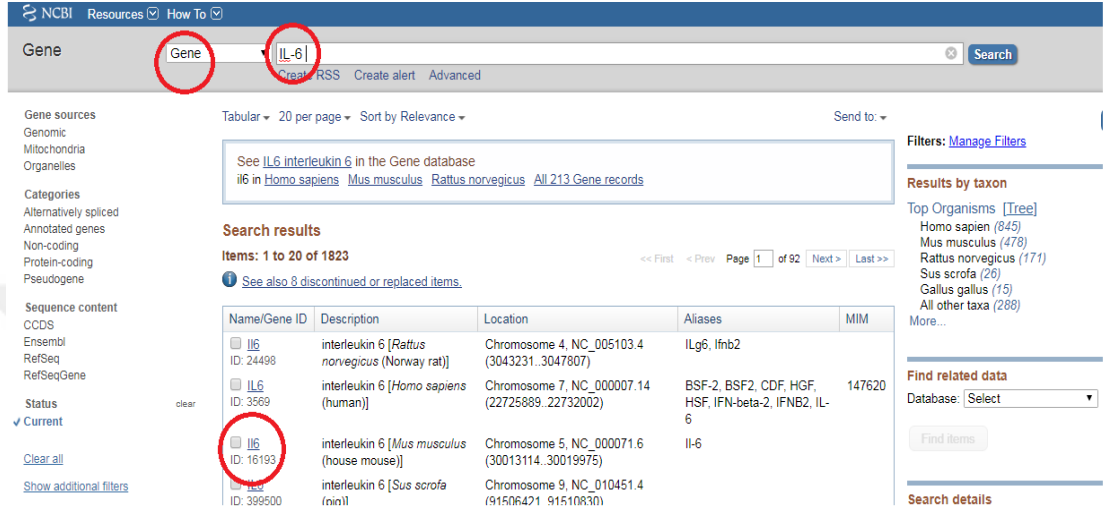
Bileşenler	Hacim	Final Konsantrasyonu
5X RT Buffer	4 µL	1X
RNaz Ribonükleaz İnhibitör (40 U/µL)	0.5 µL	20 U/reaksiyon
One Script Plus RTase (200 U/µL)	1 µL	200 U/reaksiyon

5. Bileşenlerin iyice karışması sağlanmıştır ve kısa santrifüjle tüm bileşenler 20 µL son hacimde toplanmıştır.
6. Tüm 30 dakika 50°C su banyosunda inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.
7. 5 dakika boyunca 85°C'ye ısıtılarak reaksiyonun durması sağlanmıştır. Reaksiyon tüpü buz üzerinde soğutulmuştur.
8. Sentezlenen cDNA reaksiyona ya da sonraki uygulamalar için -20°C'de uzun süreli depolamaya hazır hale getirilmiştir.

2.2.6. Moleküler markör olarak seçilen genlerin primer dizaynının yapılması

Primer dizaynı yapılırken primerlerin yaklaşık 20 baz uzunluğunda olması, kendi üstüne katlanmasının minimum olması, forward ve revers olarak seçilen primerlerin birbiriyle birleşme olasılığının düşük olması sağlanmalıdır. Bu çalışmada mRNA'nın ekspresyonu incelendiğinden dolayı primerler seçilirken 2 ekzonu da kapsayan primerler seçilmiştir. Böylelikle genomik DNA kontaminasyonu en aza indirgenmiştir.

NCBI'a göre primer tasarlarırken ilk olarak Gene sekmesinden istenen genin adı yazılmıştır (bu örnek için IL-6) ve istenen organizmada bu genin seçilmesi sağlanmıştır. Bu çalışmada *Mus musculus* hücre hattında çalışıldığından *Mus musculus* 'a ait IL-6 seçilmiştir (Şekil 2.5).



The screenshot shows the NCBI Gene database search results for 'IL-6'. The search bar contains 'Gene' and 'IL-6'. The results are displayed in a table with columns: Name/Gene ID, Description, Location, Aliases, and MIM. The table lists three entries for IL-6 in different species: Rattus norvegicus, Homo sapiens, and Mus musculus. The Mus musculus entry is circled in red.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases	MIM
<input type="checkbox"/> IL6 ID: 24498	interleukin 6 [<i>Rattus norvegicus</i> (Norway rat)]	Chromosome 4, NC_005103.4 (3043231..3047807)	IL6, Ifnb2	
<input type="checkbox"/> IL6 ID: 3569	interleukin 6 [<i>Homo sapiens</i> (human)]	Chromosome 7, NC_000007.14 (22725889..22732002)	BSF-2, BSF2, CDF, HGF, HSF, IFN-beta-2, IFNB2, IL-6	147620
<input checked="" type="checkbox"/> IL6 ID: 16193	interleukin 6 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 5, NC_000071.6 (30013114..30019975)	IL-6	
<input type="checkbox"/> IL6 ID: 399500	interleukin 6 [<i>Sus scrofa</i> (pig)]	Chromosome 9, NC_010451.4 (91506421..91510830)		

Şekil 2.5. NCBI üzerinden yapılan primer dizaynında gen ve organizmanın seçilmesi

Daha sonra sağ taraftaki sekmelerden RefSeq RNA sekmesinin seçilmesi sağlanır (Şekil 2.6). Çalışmada tüm genom değil mRNA çalışılacağından bu sekme tercih edilmiştir.

Gene neighbors
Genome
GEO Profiles
HomoloGene
Nucleotide
Probe
Protein
PubChem Compound
PubChem Substance
PubMed
PubMed (GeneRIF)
PubMed (nucleotide/PMC)
RefSeq Proteins
RefSeq RNAs
SRA
Taxonomy
UniGene

Expression
Mouse ENCODE transcriptome data
Project title: Mouse ENCODE transcriptome data
Description: RNA profiling data sets generated by the Mouse ENCODE project.
BioProject: PRJNA65167
Publication: PMID 25409824
Analysis date: n/a

Şekil 2.6. RefSeq RNA sekmesinin seçilmesi

Önümüze sadece ekzonlardan oluşan bir ekran gelecektir. mRNA'ya göre primer tasarlamak için sağ taraftaki Pic Primers sekmesinden olası primerlerin ekrana gelmesi sağlanmaktadır (Şekil 2.7).

GenBank
Send to
Change region shown
Customize view
Analyze this sequence
Run BLAST
Pick Primers
Highlight Sequence Features
Find in this Sequence
Show in Genome Data Viewer

Mus musculus interleukin 6 (Il6), transcript variant 1, mRNA
NCBI Reference Sequence: NM_031168.2
FASTA Graphics
Go to

LOCUS NM_031168 1141 bp mRNA linear ROD 27-OCT-2018
DEFINITION Mus musculus interleukin 6 (Il6), transcript variant 1, mRNA.
ACCESSION NM_031168
VERSION NM_031168.2
KEYWORDS RefSeq.
SOURCE Mus musculus (house mouse)
ORGANISM Mus_musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha;

Şekil 2.7. mRNA ekranı ve pick primers sekmesi

Primerler tasarlanırken erime sıcaklığı (T_m) forward ve reverse primer için bu primerler birlikte çalışacağından yakın olmalıdır (Şekil 2.8). Exon-exon junction'ın seçilmesi mRNA'da sadece ekzonlar olduğundan ve iki farklı ekzon seçildiğinde, genomik DNA kontaminasyonu olsa bile primer ekzon-intron-ekzon şeklindeki büyük bölgeyi çoğaltacağından genomik DNA kontaminasyonunu elimine etmek açısından önemlidir.

PCR template

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) [Clear](#)

Or, upload FASTA file Dosya seçilmedi

Range

Forward primer [Clear](#)

Reverse primer

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'→3' on plus strand) [Clear](#)

Use my own reverse primer (5'→3' on minus strand) [Clear](#)

PCR product size

of primers to return

Primer melting temperatures (Tm) [Clear](#)

Exon/intron selection

A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

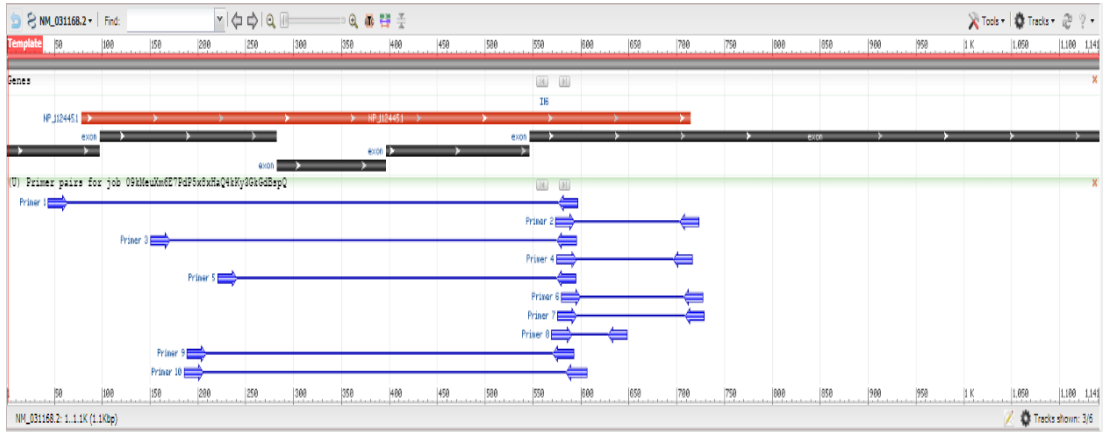
Exon junction match

Intron inclusion Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range

Şekil 2.8. Tm derecesinin ve ekzon-ekzon seçeneklerinin ayarlanması

Seçimler yapıldıktan sonra yaklaşık 10 farklı primer çifti ekrana gelecektir. Bunların hangi ekzonlar arasında olduğu bu ekranda görüntülenebilir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Primer ekranı

Farklı primer çiftleri arasından seçim yapılmıştır. Seçim yaparken forward ve reverse primerlerin Tm derecelerinin yakın olmasına, guanin sitozin oranına, kendi üzerine katlanmasının ve primer dimeri oluşturma olasılığının düşük olmasına dikkat edilmelidir. Buna göre en uygun primer çifti seçilmiştir (Şekil 2.10).

Primer pair 1	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCGACCAAGAAAGATAGTCA	Plus	20	44	83	56.95	30.00	4.00	1.00
Reverse primer	AGAGCATTGGAAATGGGGT	Minus	20	596	577	57.37	45.00	4.00	0.00
Product length	553								
Exon junction	None for forward primer. None for reverse primer								

Products on intended target
>NM_031168.2 Mus musculus interleukin 6 (IL6), transcript variant 1, mRNA

product length = 553
Forward primer 1 CCCACCAAGAAAGATAGTCA 28
Template 44 83
Reverse primer 1 AGAGCATTGGAAATGGGGT 28
Template 596 577

Şekil 2.10. Primer uygunluğunun belirlenmesi

2.2.7. PCR reaksiyonu kurulması

PCR reaksiyonları abm marka *Taq* DNA polimeraz enzimi bileşenlerin (Web-5) aşağıdaki verilen konsantrasyonlarda kullanılmasıyla kurulmuştur (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve konsantrasyonları

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
cDNA (~ 150 ng/µL)	2,5 µL	~20 ng/ µL
10 X Buffer	2 µL	1X
MgCl₂ (25 mM)	1,2 µL	1,5 mM
dNTP mix (10 mM)	0,4 µL	0,2 mM
Primer Forward(5 pmol/ µL)	2 µL	10 pmol/ µL
Primer Reverse (5 pmol/ µL)	2 µL	10 pmol/ µL
Taq DNA Polimeraz(5U/ µL)	0,2 µL	0,5 U/ µL
ddH₂O	9,7 µL	-

İlk olarak belirlenen miktarda (2,5 µL) cDNA PCR tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra diğer bileşenlerle en son enzim eklenerek bir ependorf tüpün içinde master mix hazırlanmıştır. Master mix hazırlanmasının sebebi pipetleme hatalarını en aza indirgeyip, tüpler arasında araştırmacı tarafından oluşturulabilecek farkları azaltmaktır. Master mix PCR tüplerine her birine 17,5 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. PCR reaksiyonu denatürasyon, annealing ve extension olmak üzere 3 basamaktan oluşacak şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. PCR reaksiyonunun basamakları

Sıcaklık/Süre	Döngü sayısı
95°C'de 5 dakika	1
95°C'de 30 saniye	35
55°C'de 30 saniye	
72°C'de 30 saniye	
72°C'de 10 dakika	1
4°C'de ∞	∞

2.2.8. Kantitatif PCR (qPCR) reaksiyonunun gerçekleştirilmesi

qPCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek üzere Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green kullanılmıştır. Reaksiyon aşağıdaki konsantrasyonlarda bileşenler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. qPCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
cDNA(~ 150 ng/μL)	1,5 μL	~ 15 ng/μL
Ampliçon RealQ Plus 2x Master Mix	7,5 μL	1X
Primer Forward (10pmol/ μL)	0,75 μL	0,5 pmol/ μL
Primer Revers (10 pmol/ μL)	0,75 μL	0,5 pmol/ / μL
ddH₂O	4,5 μL	-

Aşağıda verilen Çizelgedeki gibi proglamlama yapılarak qPCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.6).

Çizelge 2.6. qPCR reaksiyon basamakları

Program	Döngü Sayısı	Sıcaklık/Süre
Ön inkübasyon (Preincubation)	1X	95°C'de 15 dakika
3 Aşamalı Amplifikasyon	40X	95°C'de 30 saniye 55°C'de 30 saniye 72°C'de 30 saniye
Erime	1X	95°C'de 30 saniye 65°C'de 30 saniye 72°C'de 30 saniye
Soğuma	1X	37°C'de 30 saniye

2.2.9. Kantitatif PCR sonuçlarının $2^{-\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplanması

qPCR sonrası örneklerin değerlendirilmesi yapılırken 2 farklı yol izlenebilmektedir. Bunlar mutlak ve göreceli niceleme olarak adlandırılır. Mutlak niceleme, standart bir eğriye dayanarak giriş geni miktarını tanımlamaktadır. Göreceli nicelemede bir referans örneğe göre gen ifadesindeki değişiklikler belirlenmektedir. Göreceli niceleme standart bir eğriye gerek olmadan daha az reaktif gerektirmektedir.

Göreceli nicelemede sıklıkla kullanılan yöntem $2^{-\Delta CT}$ yöntemidir. Bu yöntemde hesaplama için qPCR sonucunda elde edilen CT (Threshold cycle) bilgisi kullanılmaktadır. Her grubun referans ve hedef geni kullanılarak hesaplanmaktadır.

CT floresan miktardaki artışın başladığı ve eşik değeri geçtiği zamanı göstermektedir ve CT değerinin küçük olması PCR ürününün erken ortaya çıktığını göstermektedir.

CT hesaplanırken her grubun örneklerinin (en az 3 farklı örneğinin) ortalaması alınmıştır. Bu, hedef gen için ve referans gen için kontrol ve uygulama gruplarında aynı şekilde tekrarlanmıştır.

Daha sonra Hedef gen-Referans gen değeri hesaplanmıştır. Buna ΔCT değeri adı verilir. Bu değer $2^{-\Delta CT}$ değeri alınmıştır ve bir kontrol grubu baz alınarak oranlama yapılmıştır. Oranlama sonucu elde edilen değerlerin 100 ile çarpılması sağlanarak grafiklerin oluşturulması sağlanmıştır.

1. Hedef gen ve housekeeping gen için oluşturulan örnek grubundaki CT değerlerinin ortalaması alınmıştır.
2. ΔCT değeri CT Ortalaması (Hedef gen)-CT Ortalaması (Housekeeping gen) şeklinde hesaplanmıştır.
3. Bu değer her örnek için $2^{-\Delta CT}$ olacak şekilde tekrar hesaplanmıştır.
4. Belirlenen kontrol grubu referans alınarak ve değeri 1 kabul edilerek kontrol grubuna göre oranlama yapılmıştır.

5. Daha sonra elde edilen değerler 100 ile çarpılıp grafik oluşturulması sağlanmıştır.

2.2.10. Verilerin istatistiki analizinin yapılması

İstatistiki analiz yapılırken Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) programının 22 surm kullanılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını öğrenmek için p değeri hesaplanmıştır. Çoklu örneklerde karşılaştırmalı analiz yapmak için uygun olan One-Way ANOVA metodu kullanılarak analiz sağlanmıştır. One-Way ANOVA içinde seçim yapılırken Post-Hoc-Tukey testi seçilmiştir ve p değeri $<0,05$ olacak şekilde ayarlanmıştır.



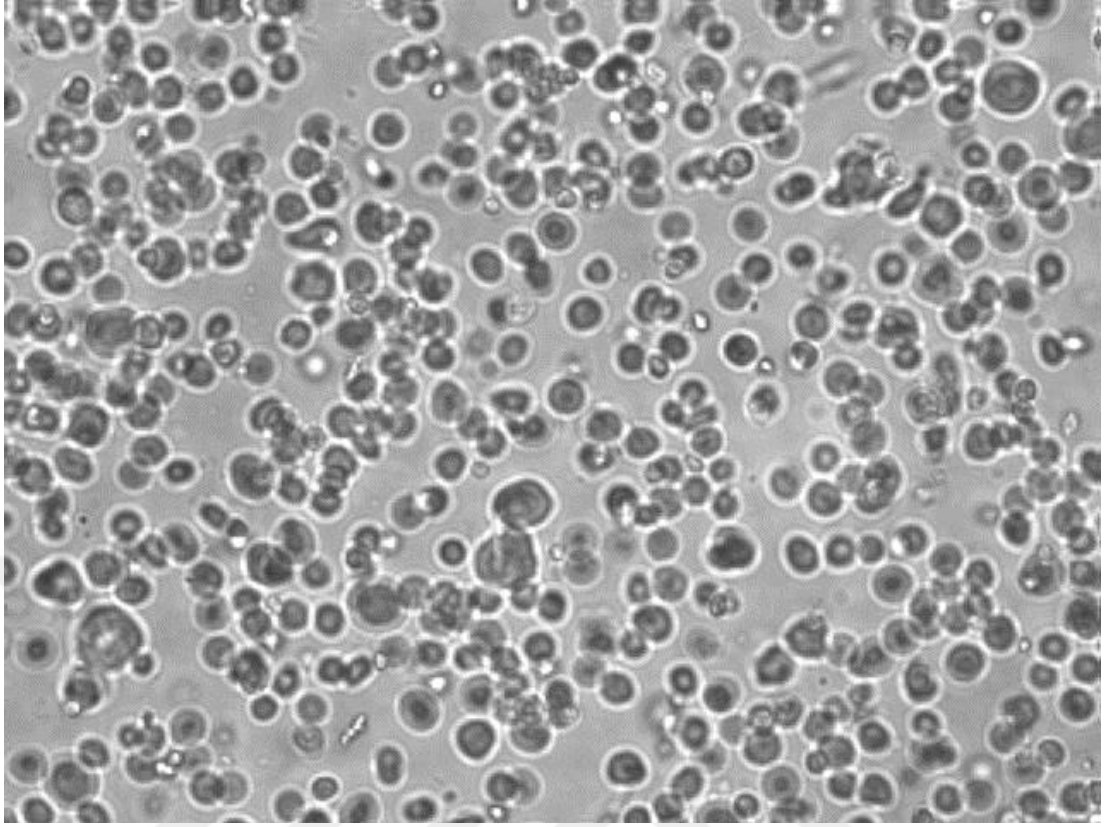
3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Hücre Hattıyla İlgili Morfolojik Gözlemler

3.1.1. Hücre kültürü çalışmaları

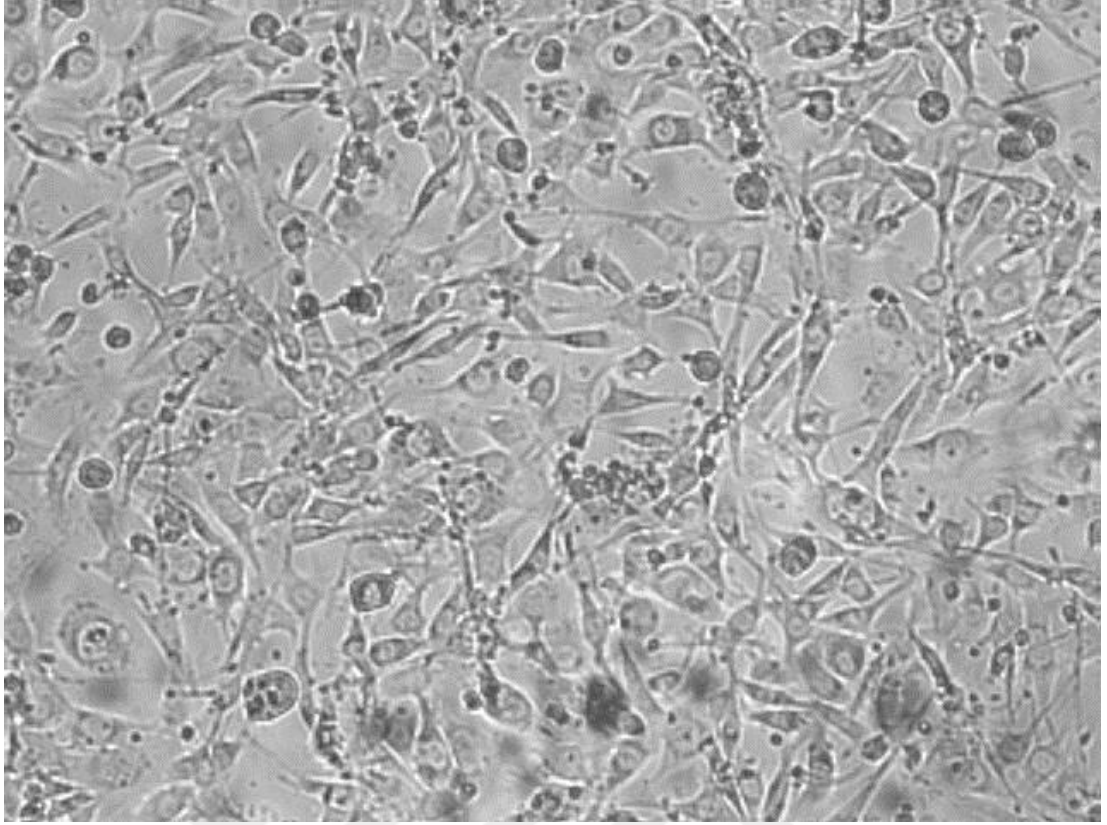
3.1.1.1. Hücrelerin çözülmesi

Hücrelerin çözülmesi yapılırken kullanılan besin ortamının daha önceden ısıtılmış olmasına ve kullanılacak kabın küçük olmasına dikkat edilmelidir. Kullanılacak kabın küçük olması hücrelerin birbirine dokunup hızlı çoğalmalarını sağlamak açısından önemlidir. Büyük hücre kültür kaplarında hücrelerin birbiriyle teması daha zor olacağından büyüme hızı yavaşlayacaktır. Ayrıca hücreler dondurulurken toksik bir kimyasal olan dimetilsüfoksitin (DMSO) su tutucu özelliğinden yararlanır. Hücreler çözüldüğünde DMSO içeren ortamıyla birlikte besin ortamına aktarılacağından DMSO'lu besiyerinin bir gün sonra ortamdan uzaklaştırılması hücrelerin sağlıklı büyümesi açısından önemlidir. Hücreler yeni çözüldüğünde fibroblastik yapının karakteristik morfolojisine henüz sahip değildirler, şekilleri yuvarlaktır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çözülen hücrelerin görünümü

Yaklaşık bir gün sonunda hücreler fibroblastik morfolojiye kavuşmaktadır (Şekil 3.2).

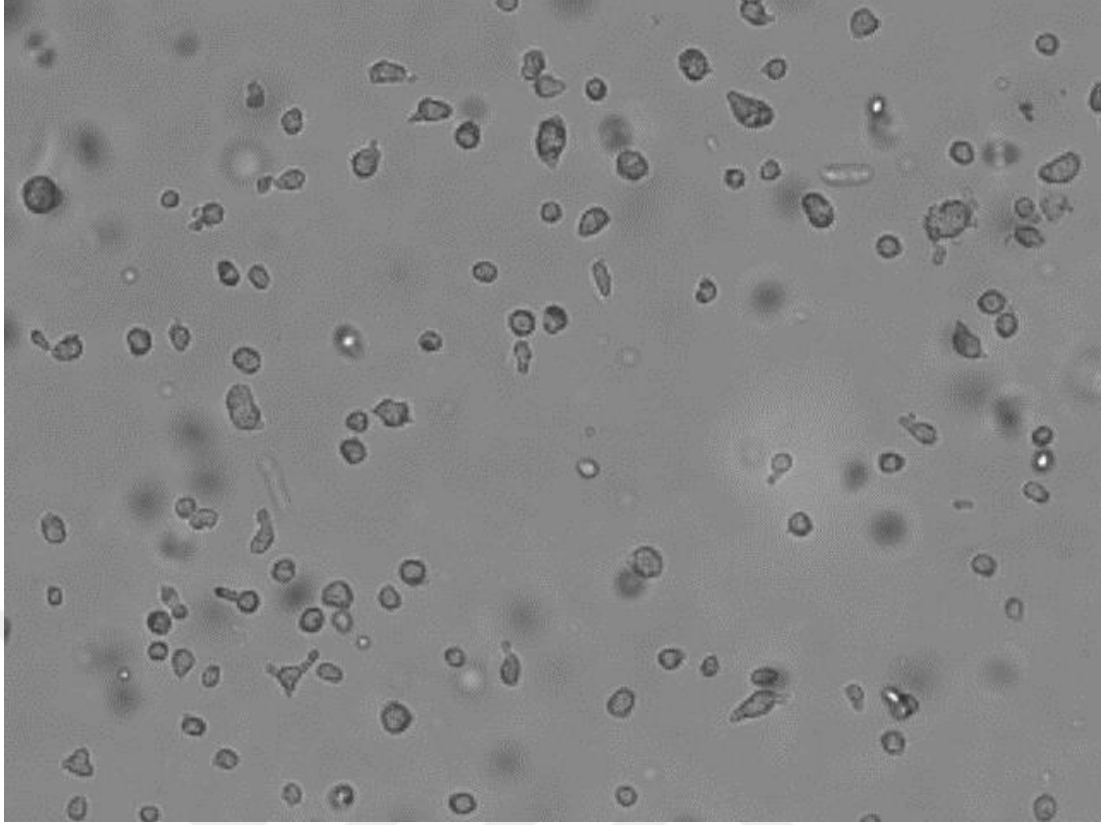


Şekil 3.2. Fibroblastik morfolojiye sahip 3T3-L1 hücrelerinin görünümü

3.1.1.2. Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması

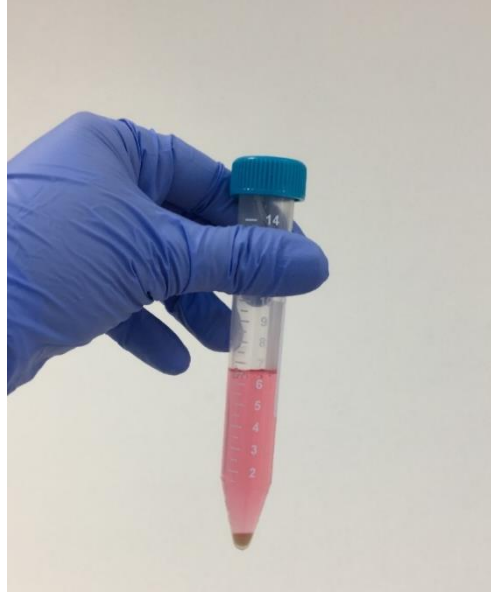
Hücreler, hücre kültür kabının tüm alanını kapladığında alt kültür edilmesi gerekmektedir. Çünkü kültür kabının tabanına yapışık halde bulunan hücreler, hücre yoğunluğu arttıkça tek tabakalı (monolayer) yapıdan çok tabakalı (multilayer) yapıya geçecektir. Bu durum hücrelerin sağlıklı bir biçimde büyümesine ve zamanla kültür kabının yüzeyiyle olan bağının kopmasına sebep olacaktır.

Hücreler %100 olarak kültür kabının yüzeyini kapladığında pasajlama işlemi yapılır. Pasajlama yapılırken 2.2.2.2.'de verilen adımlar izlenmiştir. Tripsinizasyon basamağı sonrası hücreler bulutsu ve yuvarlak bir yapıya dönüşmüştür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Tripsinizasyon sonrası hücrelerin görünümü

Tripsinizasyon adımından sonra hücrelerin 15 ml'lik falcona toplanması sağlanmıştır. (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Hücrelerin pellet olarak gözlemlenmesi

Daha sonra uygulanacak işleme göre dondurma ya da pasajlama protokolü izlenmiştir. Dondurma sonrası hücreler 1,5 ml hacime sahip kriyoviallere alınmıştır ve -80°C buzdolabına kaldırılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Dondurulan hücrelerin kriyoviallerde saklanması

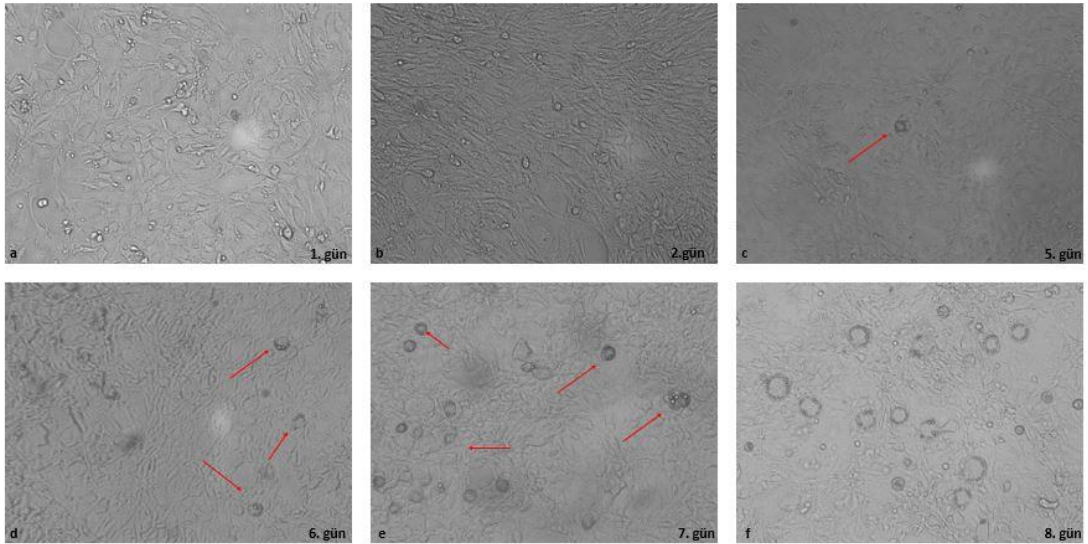
3.1.1.3. Hücrelerin diferensiyasyonu

3T3-L1 hücre hattı preadiposit yapıya sahiptir ve gerekli kimyasallar ile uyarıldığında adiposit yapıya dönüşebilmektedir. Bu özelliğinden dolayı bu hücre hattı obezite, insülin ve diyabet gibi yağ ve şeker metabolizması bozukluklarının anlaşılmasında araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır.

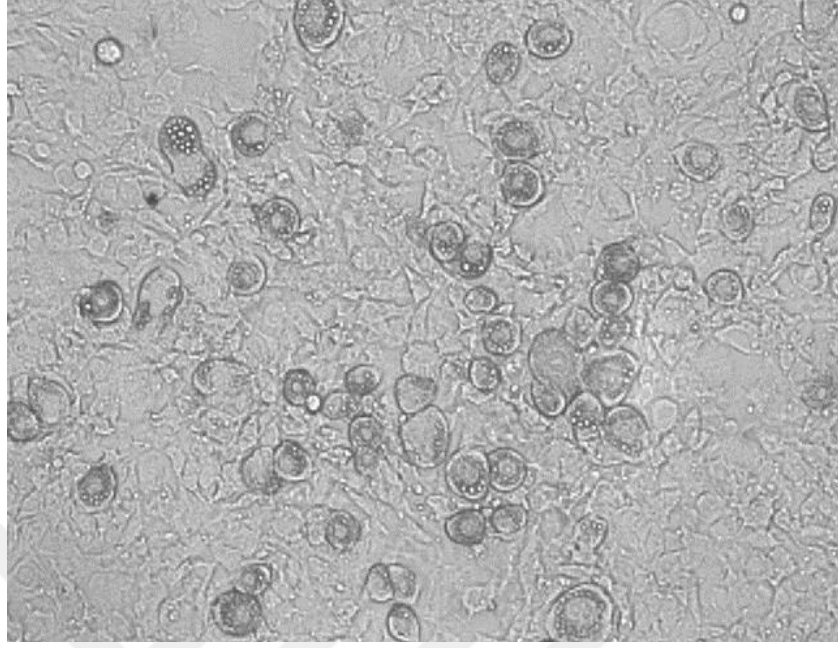
Hücreler diferensiyeye edilirken büyüme ortamı (GM) yerine insülin, IBMX, dexametazon gibi adipositeye teşvik edici kimyasallar içeren diferensiyasyon ortamları kullanılmıştır.

Yaptığımız çalışmada diferensiyasyon ortamı (DM) %1 Penisilin-Streptomisin, %5 Fetal Bovine Serum (FBS) %94 DMEM kullanılarak hazırlanmıştır. Gerekli kimyasallar uygulamadan hemen önce preheat diferensiyasyon ortamı içine eklenmiştir.

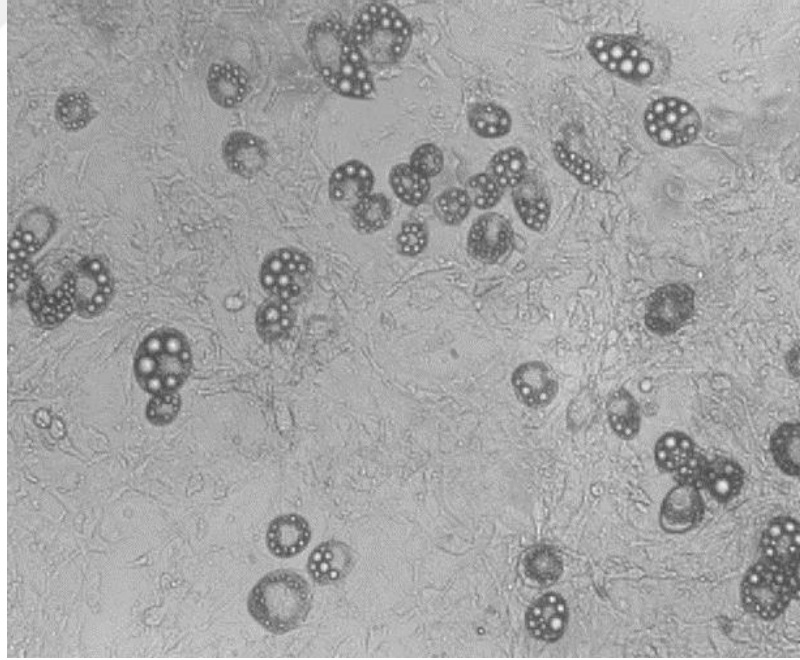
Yaklaşık olarak diferensiyasyonun ortamları verilmesinin 5. Gününde adipositler görülmeye başlanmıştır. 1 haftadan sonra adipositler iyice yayılım göstermiştir (Şekil 3.6). 2 hafta sonunda adipositler tüm kültür kabını kaplamıştır (Şekil 3.7.1; 3.7.2)



Şekil 3.6. Hücrelerin diferensiyasyonu



Şekil 3.7.1. 2 Haftalık diferensiyasyon sonrası hücrelerin görünümü



Şekil 3.7.2. 2 Haftalık diferensiyasyon sonrası hücrelerin görünümü

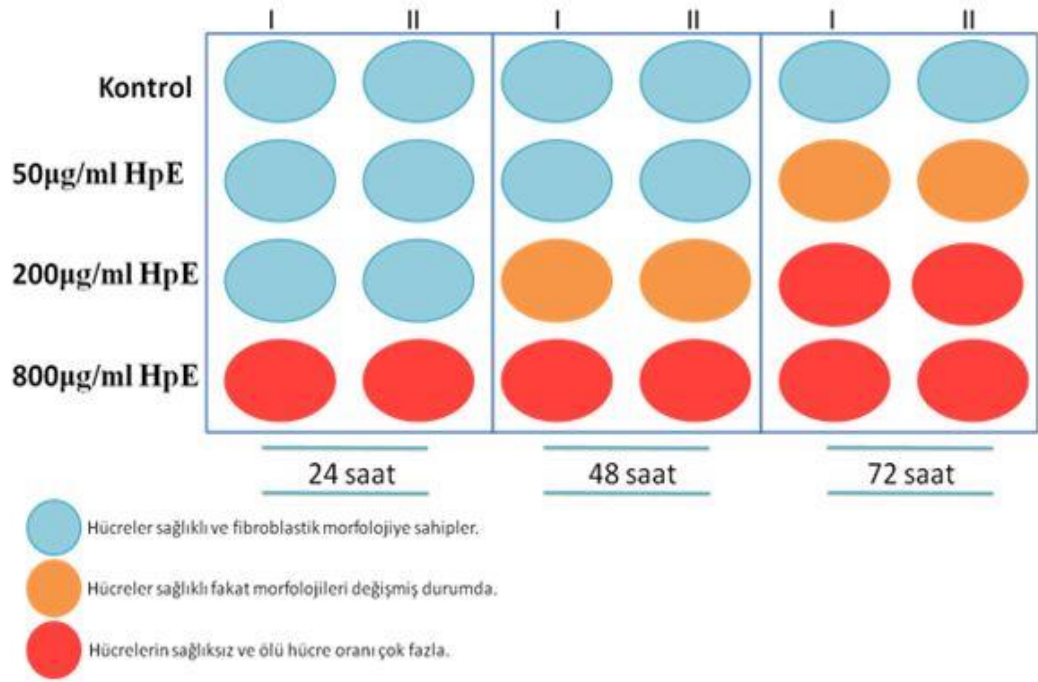
3.1.2 3T3-L1 hücre hattına *Hypericum perforatum* L. ekstraktı konsantrasyon deneme çalışmaları sonuçları

Kontrol ve 50, 200, 800 µg/ml uygulaması sonunda elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir (Şekil 3.8).

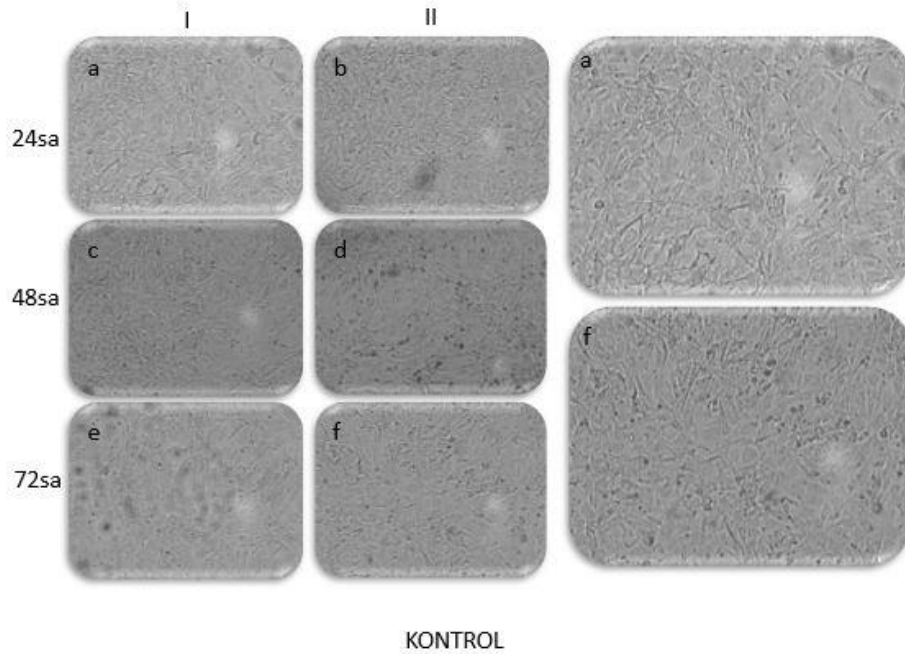
Doz denemeleri sonucunda elde edilen bulgulara göre çözücü olarak kullanılan metanolün kendi başına hücreler üzerinde toksik bir etkisi bulunmamaktadır. Dolayısıyla seçilen çözücü hücreler için uygun olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.9).

Hücrelere 50 µg/ml ve 200 µg/ml ekstrakt verildiğinde ilk olarak büyüme ortamının rengine sararma gözlemlenmiştir. Bu değişimin ortamın pH değişimi ile alakalı olduğu hücrelere bakıldığında sağlıklı olduğu fakat 50 µg/ml ekstrakt uygulanan hücrelerin 72 saatlik kısmında ve 200 µg/ml ekstrakt uygulanan hücrelerin 48 ve 72 saatlik kısmında fibroblastik morfolojinin önemli ölçüde değişim geçirdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.10,3.11).

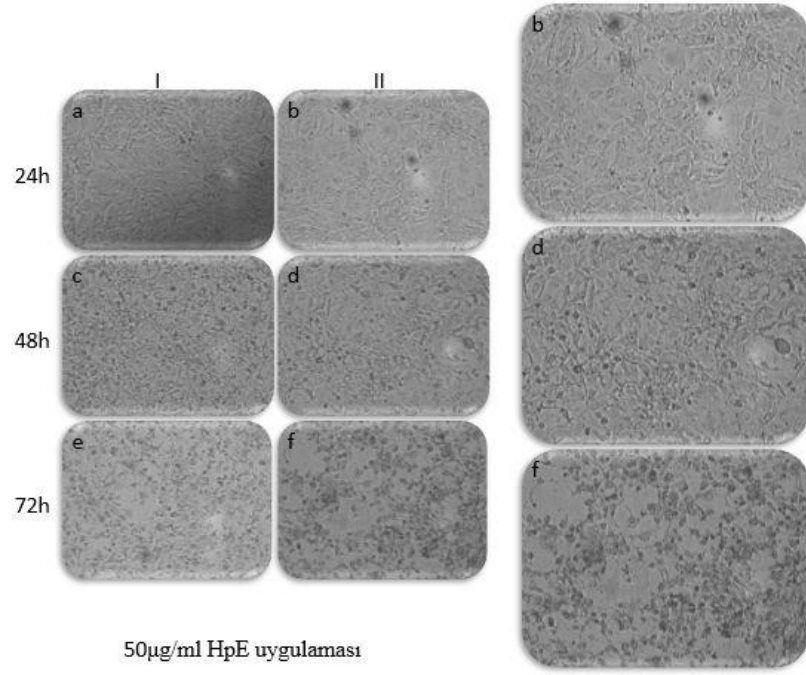
800 µg/ml ekstrakt uygulanan kısımda büyüme ortamının rengi değişmemiştir, çünkü bu dozda ekstrakt hücrelerin büyüme ortamını kullanamadan hızla ölmesine sebep olmuştur. Dolayısıyla bu doz 3T3-L1 hücreleri için toksiktir ve kullanılabilir değildir (Şekil 3.12).



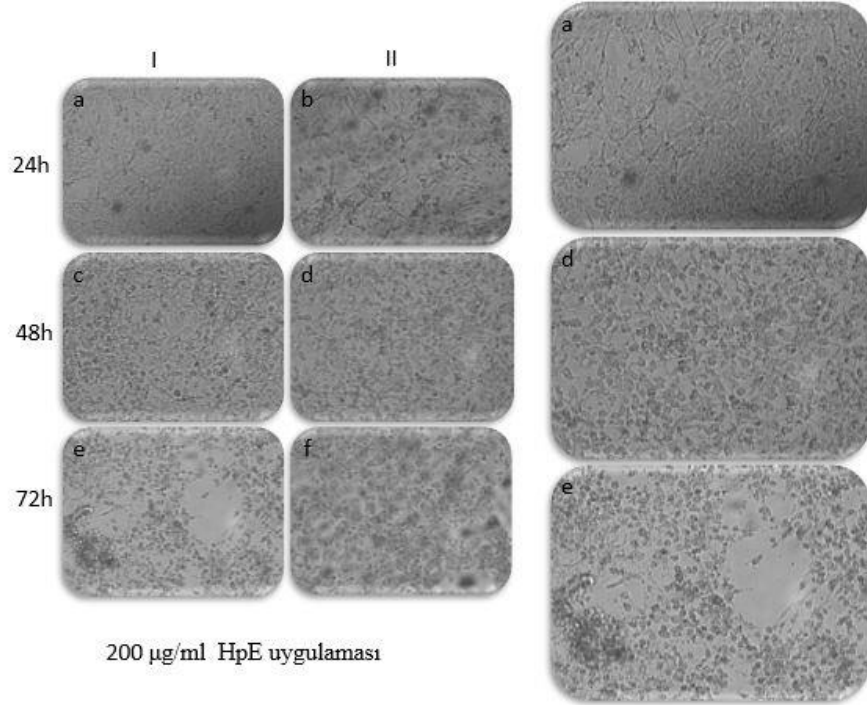
Şekil 3.8. Metanolde çözülmüş *H.perforatum* ekstraktlarının artan dozlarda ve farklı zaman aralıklarında hücrelere uygulanması



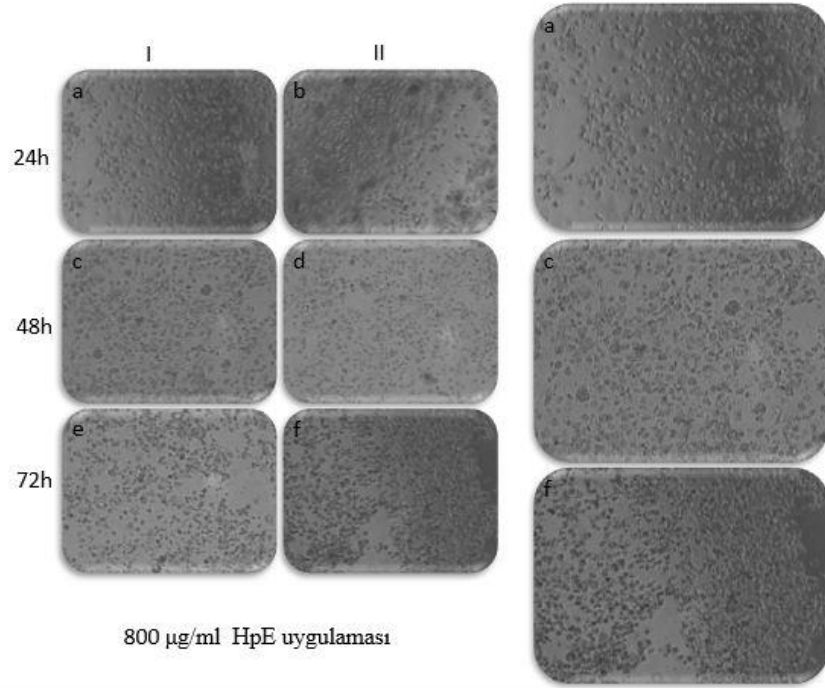
Şekil 3.9. Metanolün hücreler üzerindeki etkisinin gözlemlenmesi



Şekil 3.10. 50 µg/ml *H.perforatum* ekstraktının hücelere olan etkisi



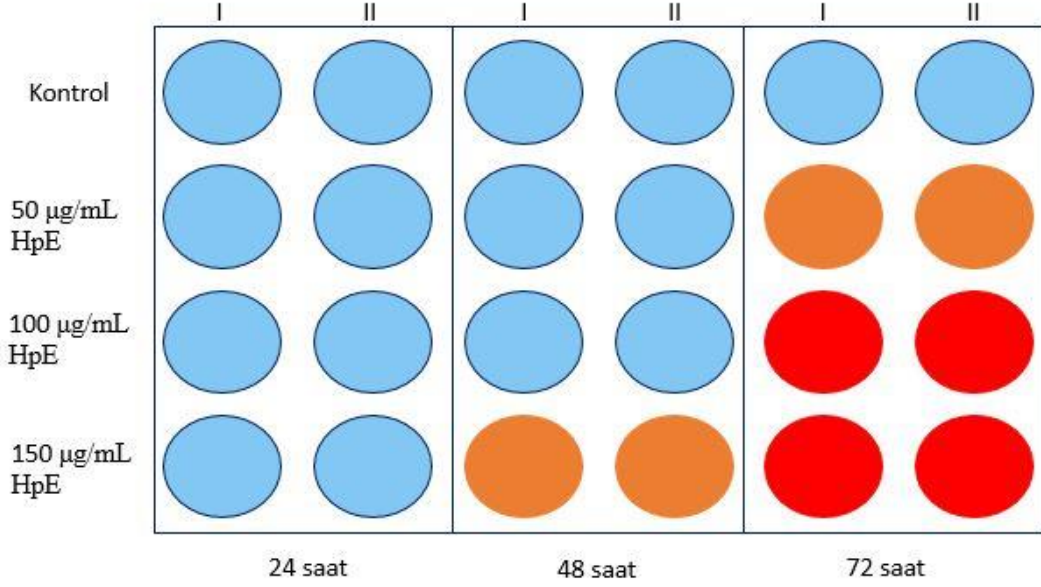
Şekil 3.11. 200 µg/ml *H.perforatum* ekstraktının hücelere olan etkisi



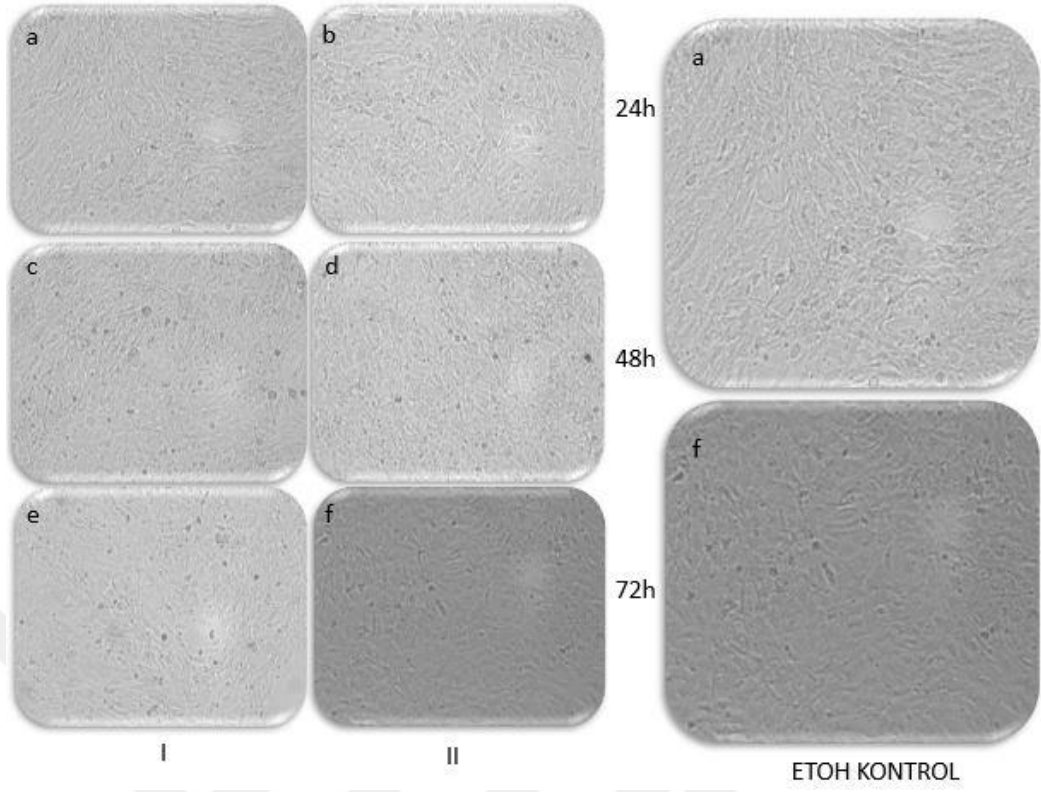
Şekil 3.12. 800 µg/ml *H.perforatum* ekstraktının hücrelere olan etkisi

Bu deneme sonunda *H.perforatum*'un 50, 200 ve 800 µg/ml doz uygulamasında, 200 ve 800 µg/ml'lik dozlar sitotoksik bulunduğu için bu dozlar yerine *H.perforatum* etanol ve metanol çözücülerıyla oluşturulmuş ekstraktlarının 100 ve 150 µg/ml'lik dozları hazırlanarak denemeler kurulmuştur (Şekil 3.13, 3.18). Bu denemeler sonucunda her iki çözücüyle elde edilen dozların denendiği hücrelerde 72 saatlik kısımlarda toksisite meydana geldiği gözlemlenmiştir. Hem etanol hem de metanol ile hazırlanan kontrol gruplarında hücre canlılığının korunduğu ve sitotoksik etki oluşmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.14, 3.19) Her iki deneme grubu için 50 ve 100 µg/ml konsantrasyona sahip dozların 24 ve 48 saatlik kısımları uygun bulunmuştur (Şekil 3.15, 3.16, 3.20, 3.21) 72 saatlik kısımlarda hücre morfolojisinde değişimler gözlemlenmiştir. 150 µg/ml'lik dozlar içinse sadece 24 saat uygun bulunmuştur. 48 saatlik kısımda hücre morfolojisinde değişiklikler ve 72 saatlik kısımda hücrelerde

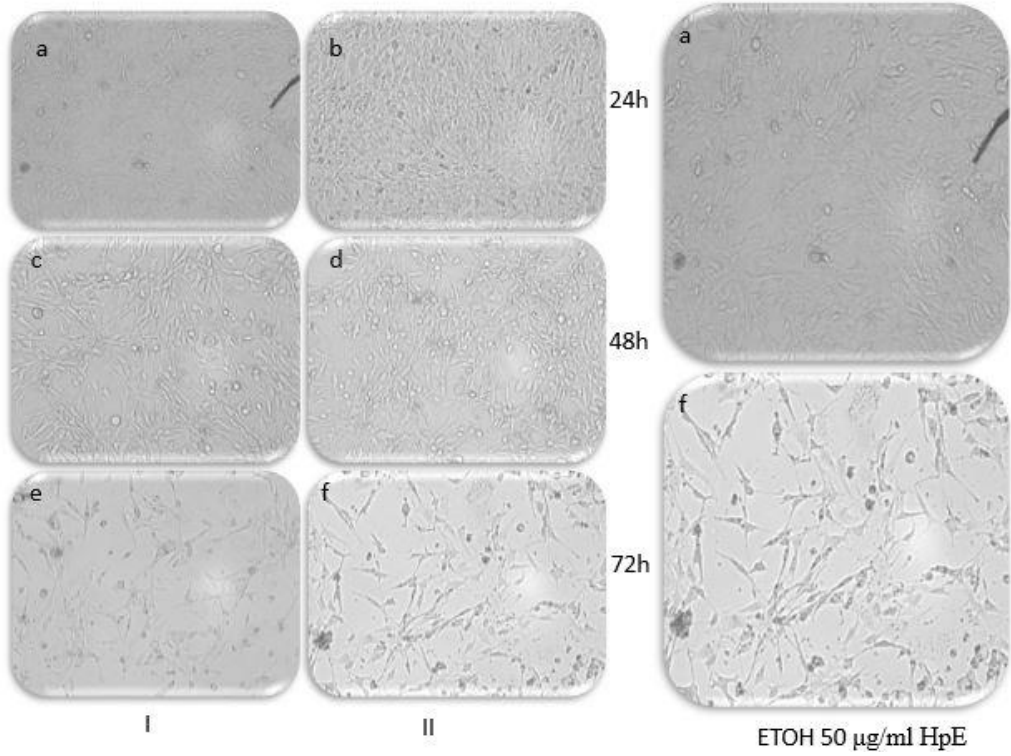
açılmalar gözlemlenmiştir (Şekil 3.17, 3.22). Bu denemeler sonucunda diferensiyeye edilmiş hücrelerde 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarının 24 ve 48 saat olacak şekilde uygulanmasına karar verilmiştir.



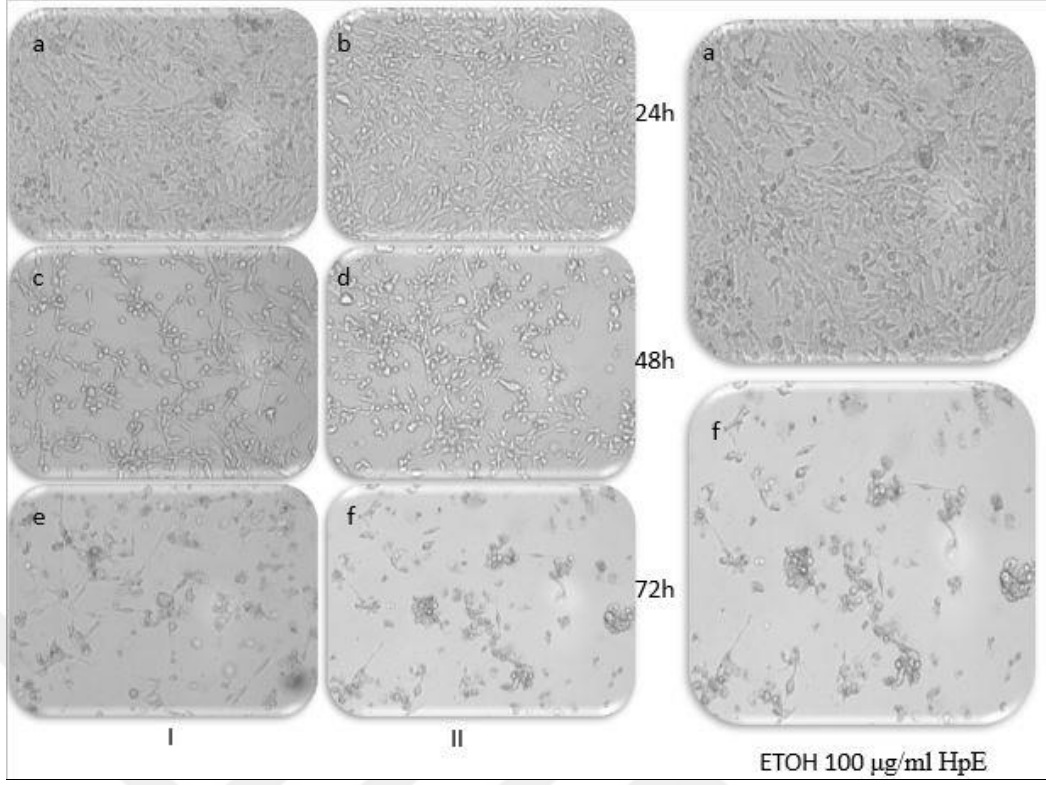
Şekil 3.13. 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml etanolde çözülmüş *H.perforatum* ekstraktı uygulaması sonucu (mavi renk sağlıklı hücreleri, turuncu renk canlı ama morfolojisi değişmiş hücreleri, kırmızı renk ise sağlıklı ve ölü hücreleri göstermektedir)



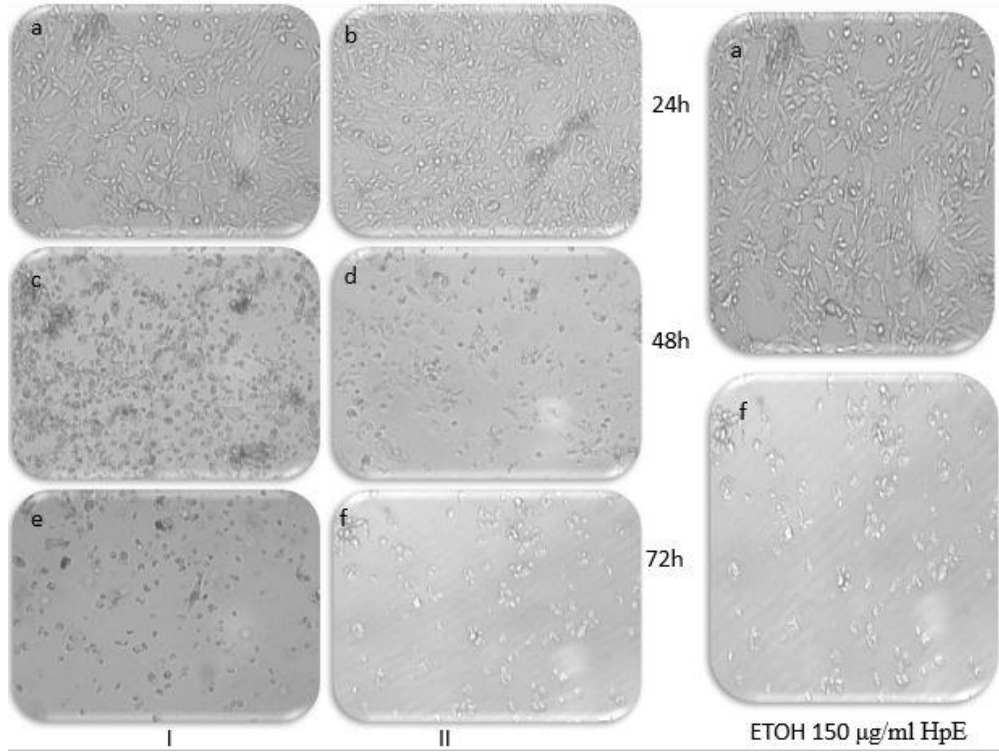
Şekil 3.14. Hürelere etanol uygulanması



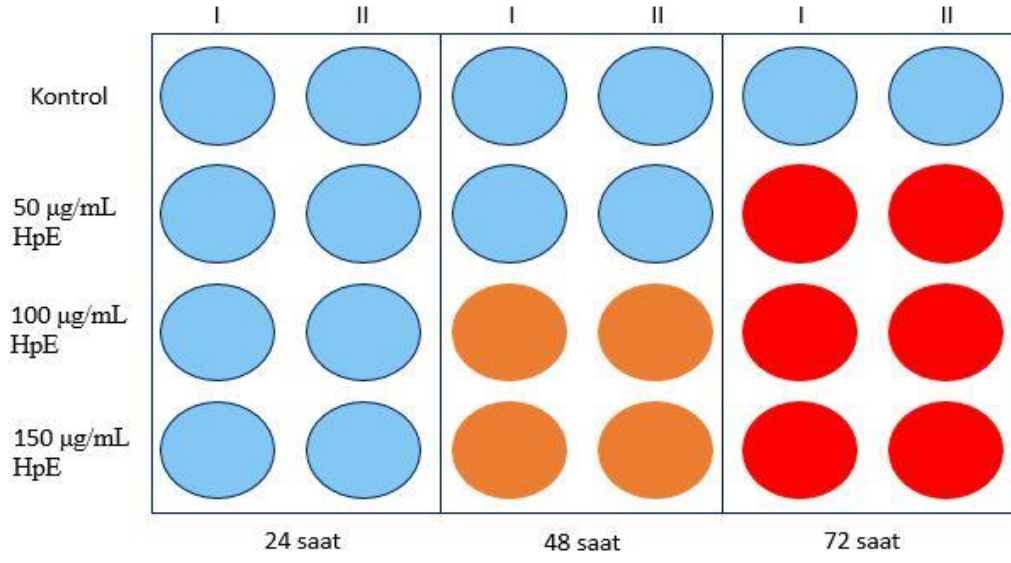
Şekil 3.15. Hürelere 50 µg/ml etanolde çözülmüş *H.perforatum* ekstraktı uygulanması



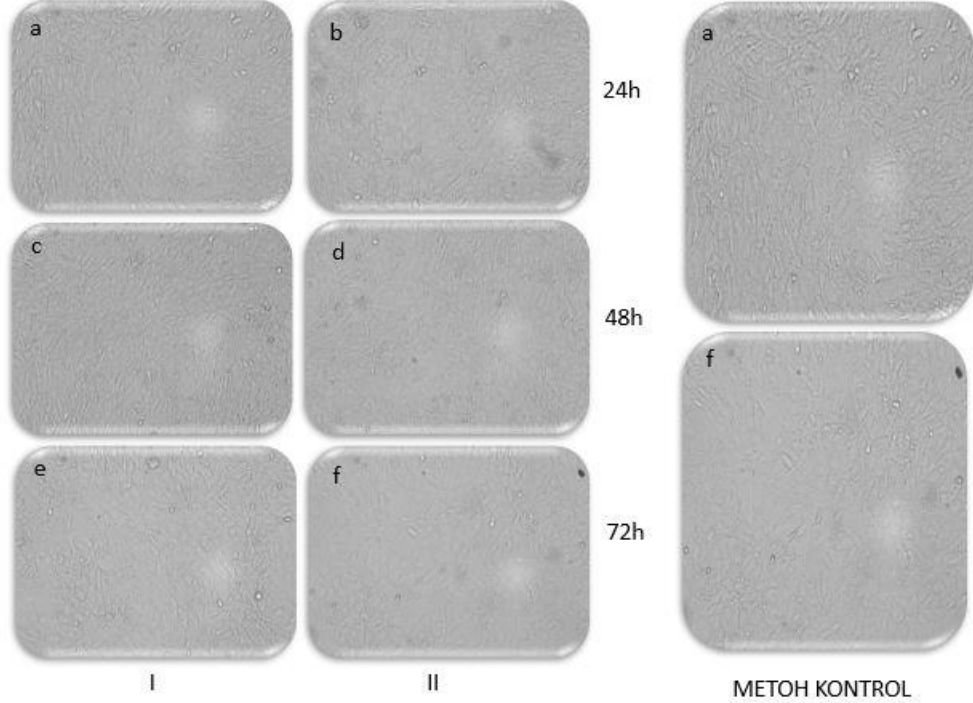
Şekil 3.16. Hücelere 100 µg/ml etanolde çözülmüş *H.perforatum* ekstraktı uygulanması



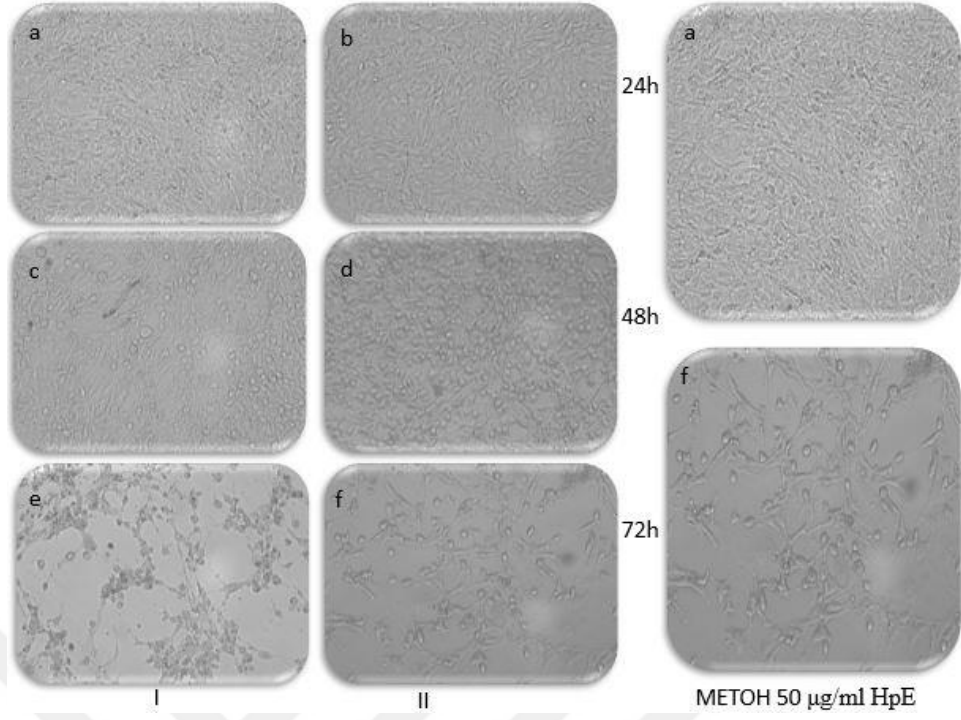
Şekil 3.17. Hücelere 150 µg/ml etanolde çözülmüş *H.perforatum* ekstraktı uygulanması



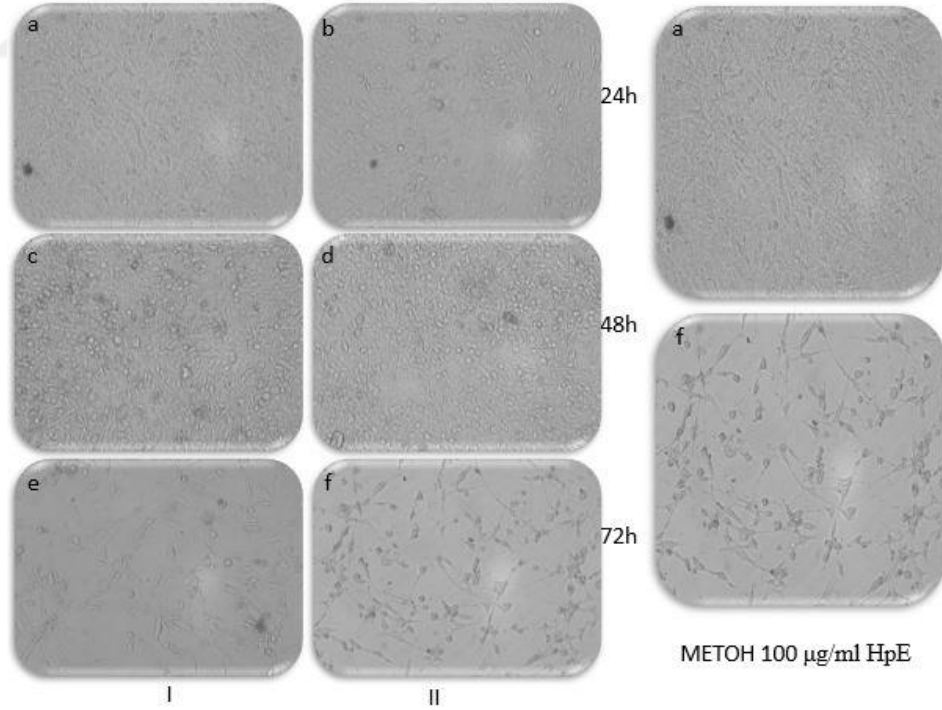
Şekil 3.18. 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml metanolde çözülmüş *H.perforatum* ekstraktı uygulaması sonucu (mavi renk sağlıklı hücreleri, turuncu renk canlı ama morfolojisi değişmiş hücreleri, kırmızı renk ise sağlıklı ve ölü hücreleri göstermektedir)



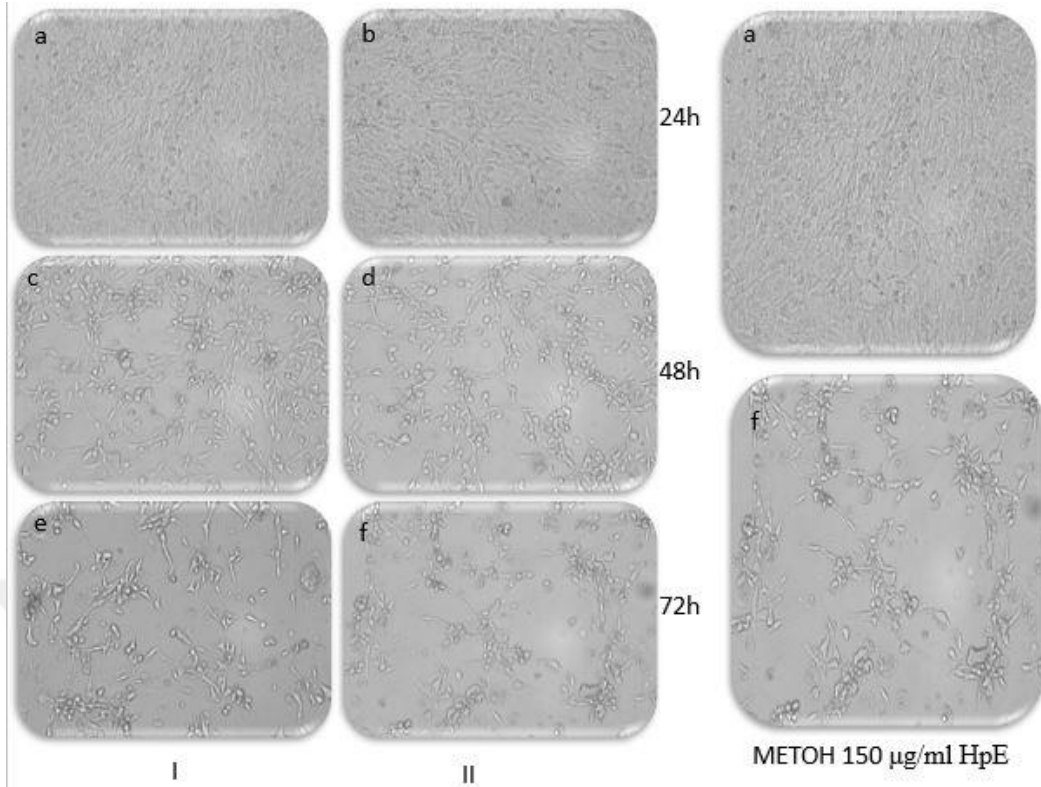
Şekil 3.19. Hücelere metanol uygulanması



Şekil 3.20. Hücelere 50 µg/ml metanolde çözülmüş *H.perforatum* ekstraktı uygulanması



Şekil 3.21. Hücelere 100 µg/ml metanolde çözülmüş *H.perforatum* ekstraktı uygulanması



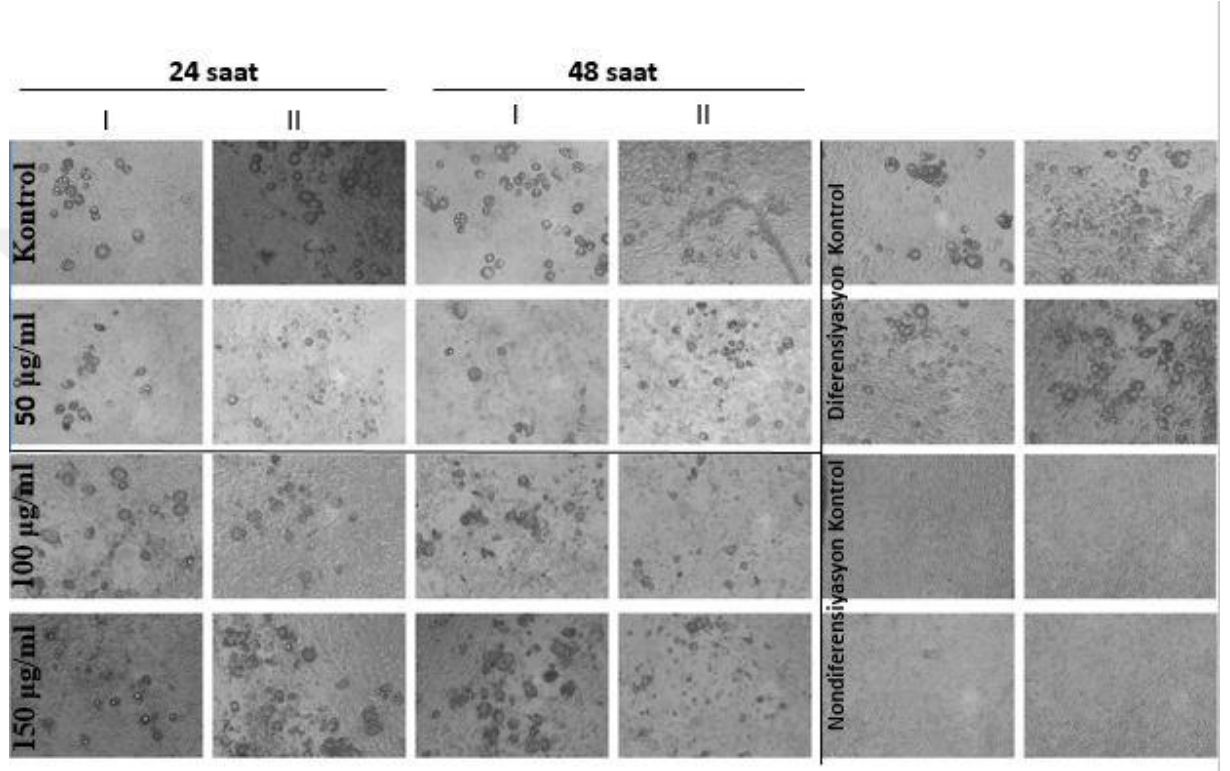
Şekil 3.22. Hücelere 150 µg/ml metanolde çözülmüş *H.perforatum* ekstraktı uygulanması

Hücre canlılık deneyleri sonucunda hem metanol hem de etanol çözücüsü için 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 150 µg/mL *H.perforatum* ekstraktı içeren besin ortamının 24 ve 48 saatlik uygulamalarının diferensiyasyon edilmiş hücelere uygulanmasına karar verilmiştir. Bu uygulamayı yapmak üzere 3T3-L1 hücrelerinin 24-well platelerde kültüre alınması sağlanmıştır. Hücrelerin yoğunluğu %70 civarına ulaştığında diferensiyasyon için ilk adım olan pre-diferensiyasyon besiyeri uygulaması yapılmıştır. Hücreler diferensiyasyon halindeyken de büyümesini sürdüreceğinden %70-80 civarında diferensiyasyona başlamak önemlidir. Eğer %100 yoğunluğa ulaştıktan sonra diferensiyasyon başlatılırsa hücreler yeterli süre kültür kabında sağlıklı büyüme ve gelişmelerini sürdüremeyeceklerdir.

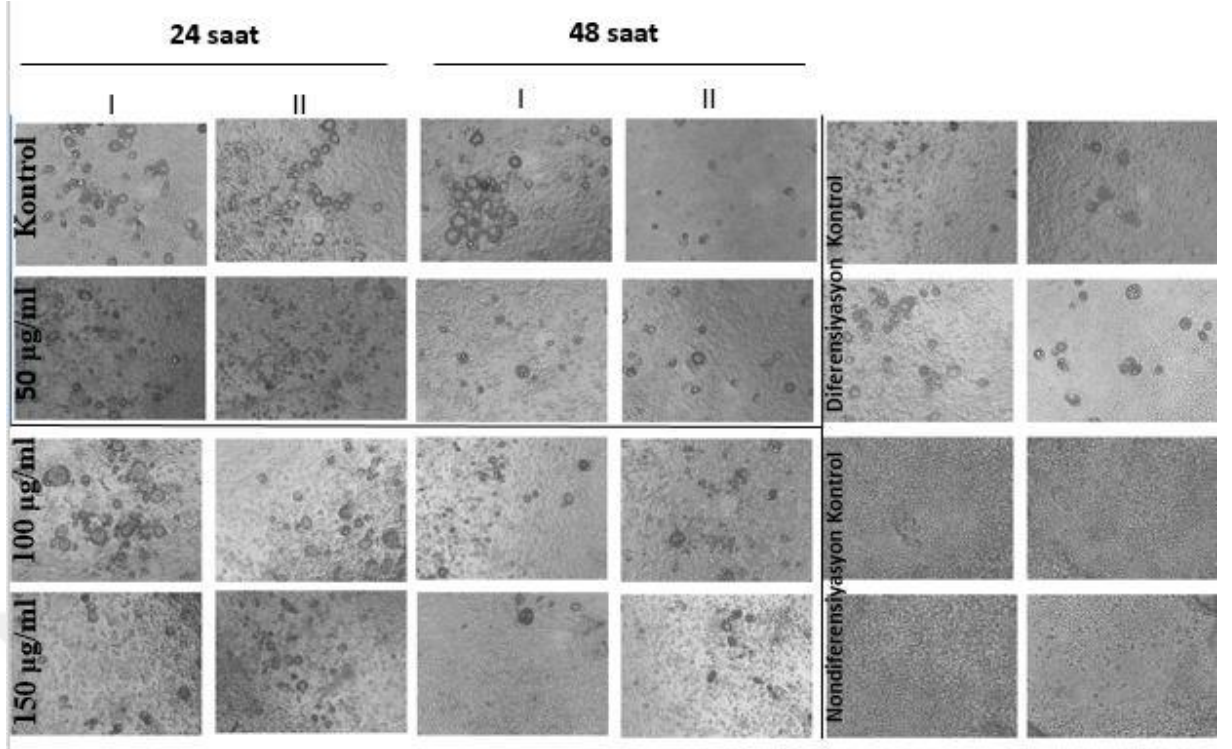
Pre-diferensiyasyon besiyerinde IBMX, dexametazon ve insülin gibi hücreleri adipositeye stimüle edici kimyasallar bulunmaktadır. 48 saat bu besiyeri uygulandıktan sonra hücreler Diferensiyasyon besiyeri olarak adlandırılan insülin

içeren besiyeri ile muamele edilmiştir. Bu besiyerinin 48 saatte bir değişmesi sağlanmıştır.

Bizim uygulamamızda diferensiyasyon ve bitki ekstraktı uygulaması 14 gün sürmüştür. 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 150 µg/mL *H.perforatum* L. ekstraktı uygulaması 24 saat ve 48 saat olmak üzere iki farklı zaman uygulaması şeklinde yapılmıştır. İlk deneme için hem etanol hem metanol çözücüsü kullanılmıştır (Şekil 3.23, 3.24).

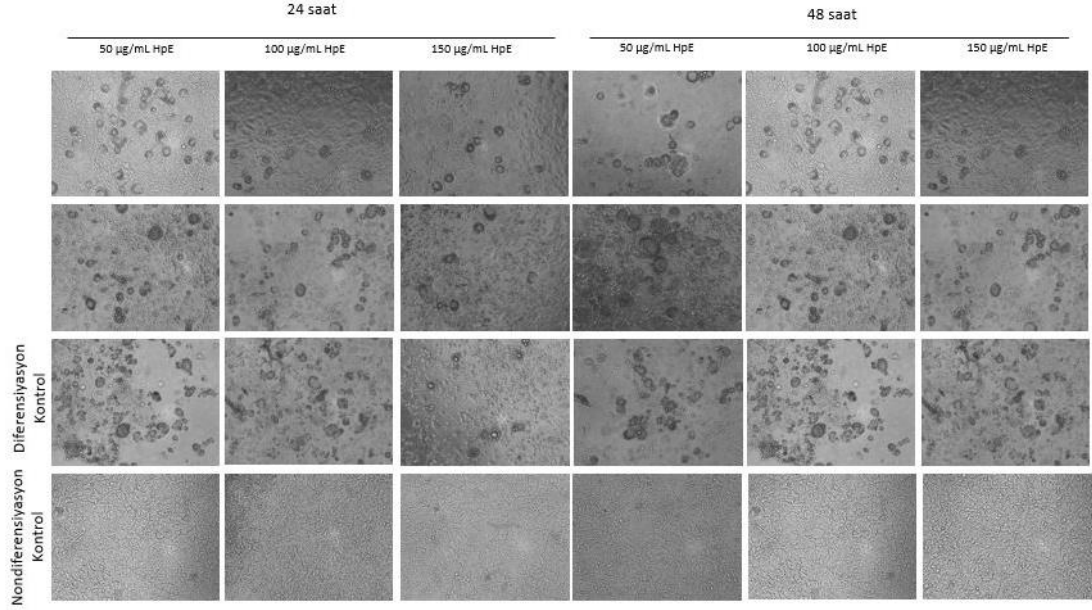


Şekil 3.23. Artan dozlarda etanolde çözülmüş ekstrakt uygulanan 3T3-L1 adipositlerinin ve kontrol gruplarının uygulama sonrası görüntüsü

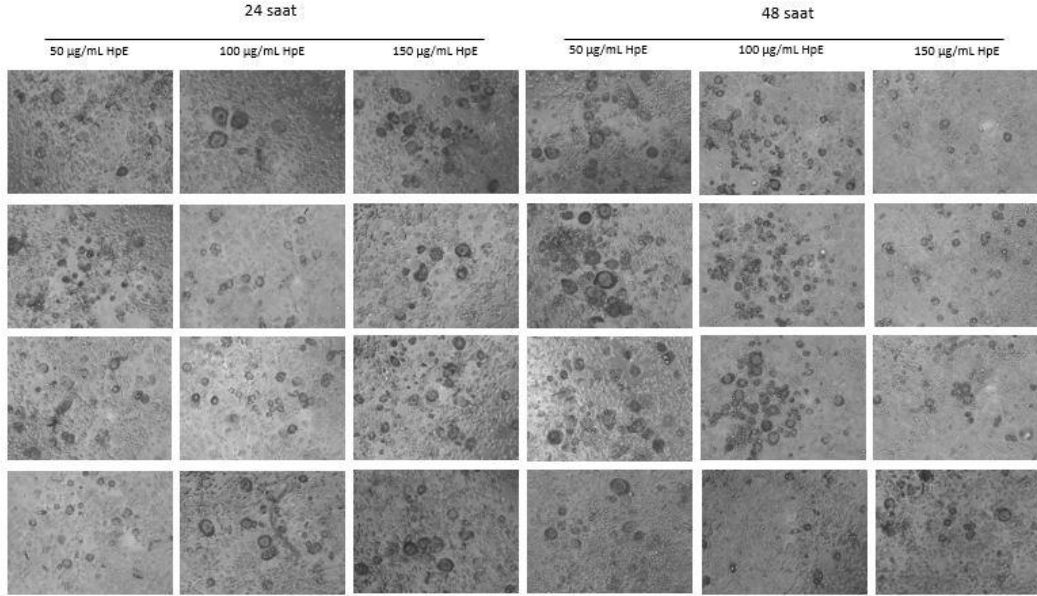


Şekil 3.24. Artan dozlarda metanolde çözülmüş ekstrakt uygulanan 3T3-L1 adipositlerinin ve kontrol gruplarının uygulama sonrası görüntüsü

İlk deneme hem etanol hem metanol çözücüsü için kurulmuştur. Fakat hücre canlılık deneylerinin ve diferensiyasyon deneylerinin sonucunda çözücüler arasında kayda değer bir fark gözlemlenmediği için deneyin 2. ve 3. tekrarları etanolde çözülen *Hypericum perforatum* L. ekstraktı kullanılarak yapılmıştır. Bu denemelerde 50 µg/mL, 100 µg/mL ve 150 µg/mL *H.perforatum* L. etanolde çözülmüş ekstraktının 24 ve 48 saat uygulaması gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık olarak diferensiyasyonun 12. gününde bitki ekstraktı uygulaması başlatılmıştır ve 14. günde hücrelerin RNA'larının toplanması sağlanmıştır (Şekil 3.25, 3.26)



Şekil 3.25. Artan dozlarda etanolde çözülmüş ekstrakt uygulanan 3T3-L1 adipositlerinin ve kontrol gruplarının uygulama sonrası görüntüsü

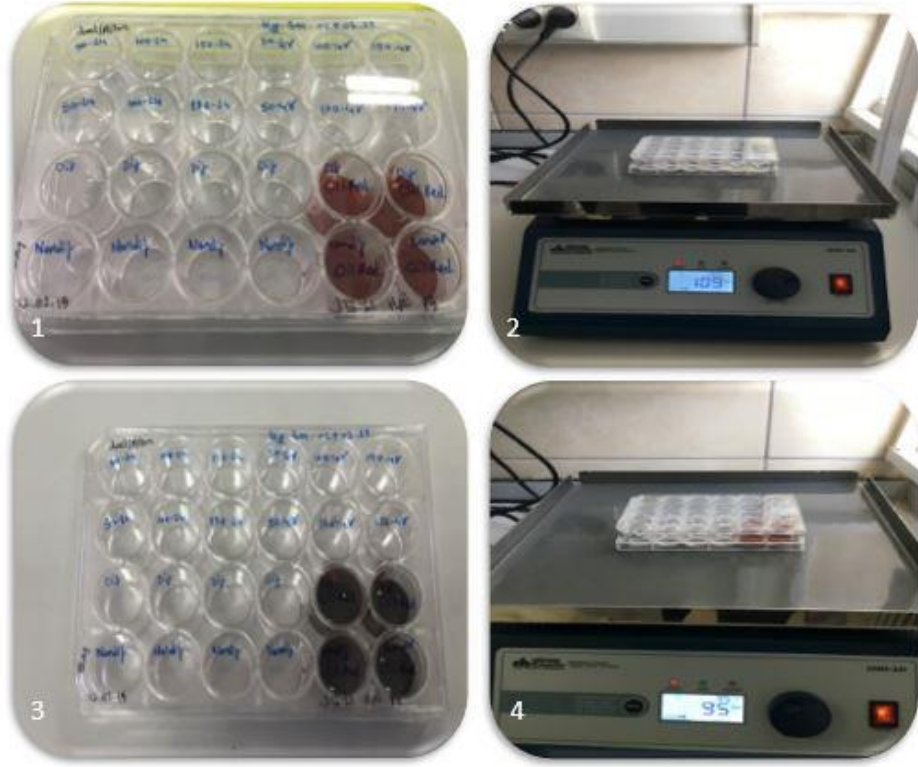


Şekil 3.26. Artan dozlarda etanolde çözülmüş ekstrakt uygulanan 3T3-L1 adipositlerinin uygulama sonrası görüntüsü

3.1.3. Diferensiye edilen hücelere Oil Red O boyama yapılması

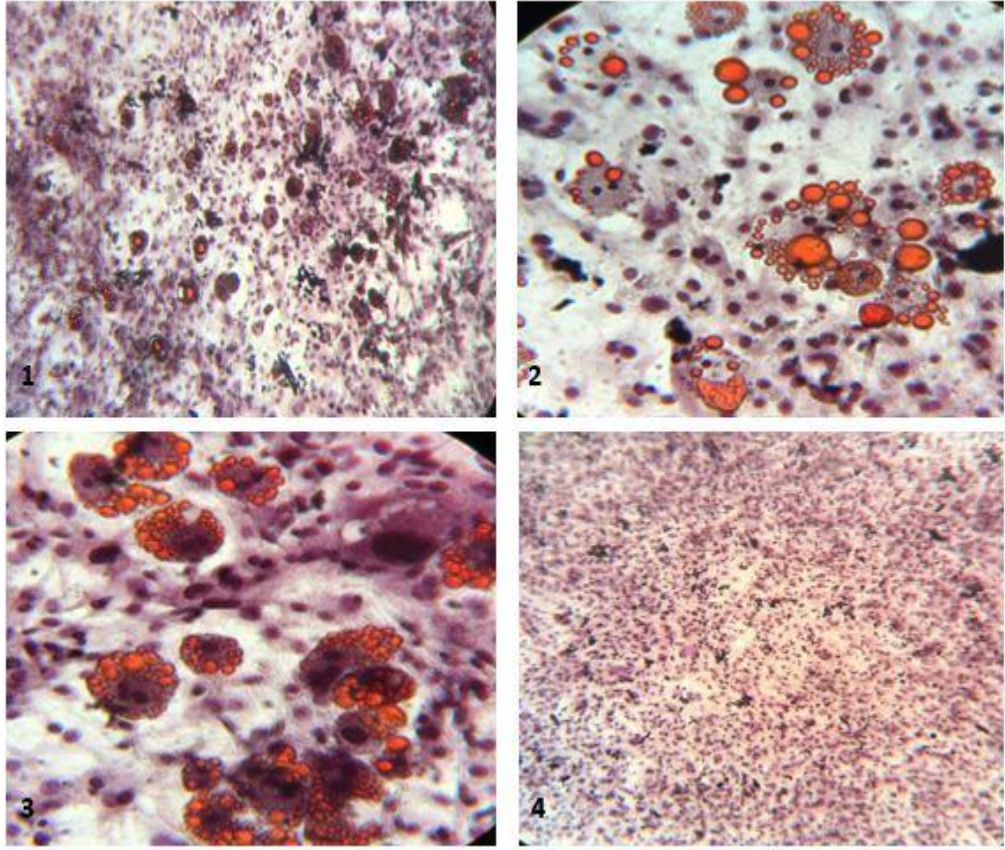
Lipit damlacıkları tüm ökaryotik canlılarda bulunur. Bunlar nötral lipidleri, birincil triaçilgliseroller ve kolesterol esterlerini depolama görevi görürler. Depolanmış lipidler enerji, steroid sentezi ve membran yapısı için kullanılabilir. Lipid damlacık birikimi hücelerde normal bir işlemdir (Web-6). Adipositler ağırlıklı olarak lipit damlacıklarından oluşur. Bununla birlikte, hüceler içindeki aşırı lipit damlacık birikimi, metabolik eksiklik veya patojenezin bir göstergesi olabilir. Oil Red O boyama hücre hatlarında nötral lipidlerin seçici olarak belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. Kullandığımız kitte bulunan başka bir boya olan hematoksilen çekirdeğin boyanmasına yarayan maddedir (Web-6).

Oil Red O boyama yapılırken 3.2.2.4.'te verilen protokol takip edilmiştir. Fiksasyonu sağlanan hücelerin Oil Red O ve hematoksilen boyalarıyla boyanmaları sağlanmıştır (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. Oil Red O boyama işlemi

Boyama sonrası adipositler kırmızı renk alırken diferansiye olmamış hücrelerde kırmızıya boyanma görülmemiştir. Çekirdekler her iki grubun boyanması sonrası hematoksilenden dolayı mavi-mor renkte gözlemlenmiştir (Şekil 3.28).



Şekil 3.28. Oil Red O boyama sonrası hücrelerin elektron mikroskobu altında görüntüleri 1,2,3 diferensiyeye olmuş hücreleri; 4, diferensiyeye olmamış hücreleri göstermektedir (1 ve 4 10x'lik büyütme; 2 ve 3 40x'lik büyütmede alınan görüntüler)

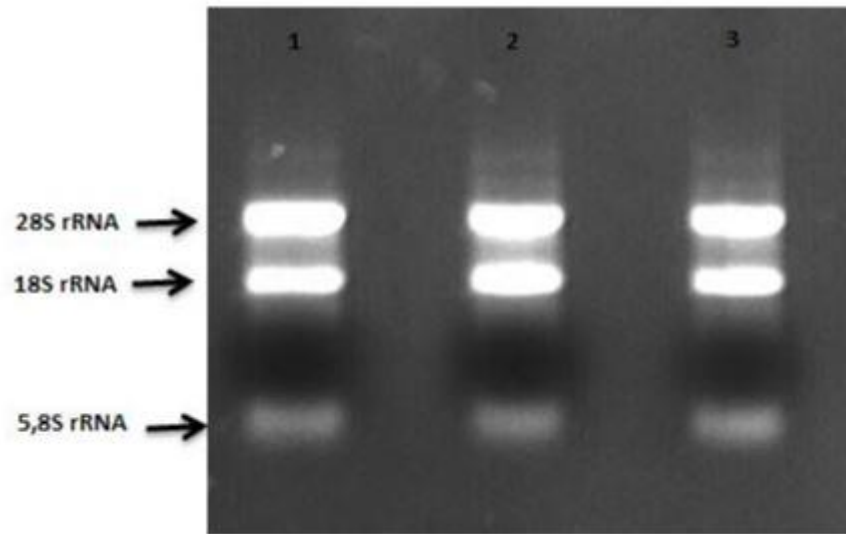
3.2. RNA izolasyon sonuçları

Elde edilen RNA'ların kalitesinin değerlendirilmesi ve konsantrasyonunun ölçülmesi için spektrofotometrik ve elektroforetik analiz yapılmıştır. Aşağıdaki çizelgede RNA izolasyonu sonucu elde edilen değerler örnek olması açısından verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 2.1 RNA örneklerinin spektrofotometrik analizi

	1	2	3
Konsantrasyon (ng/µl)	953	1143	1153
260/280	1,95	2	1,92
260/230	1,20	1,17	1,03

Elektroforetik analiz RNA'nın kalitesini ölçer. RNA'nın rRNA alt birimleri elektroforezde görüntülenebilecek kadar büyük ve çoktur diğer RNA molekülleri elektroforezle görüntülenemezler. rRNA'nın 3 alt birimi vardır: 28S, 18S ve 5.8S. Çalışmamızda bu alt birimler agaroz jel elektroforezi aracılığıyla 3 bant şeklinde gözlemlenebilmiştir (Şekil 3.29).

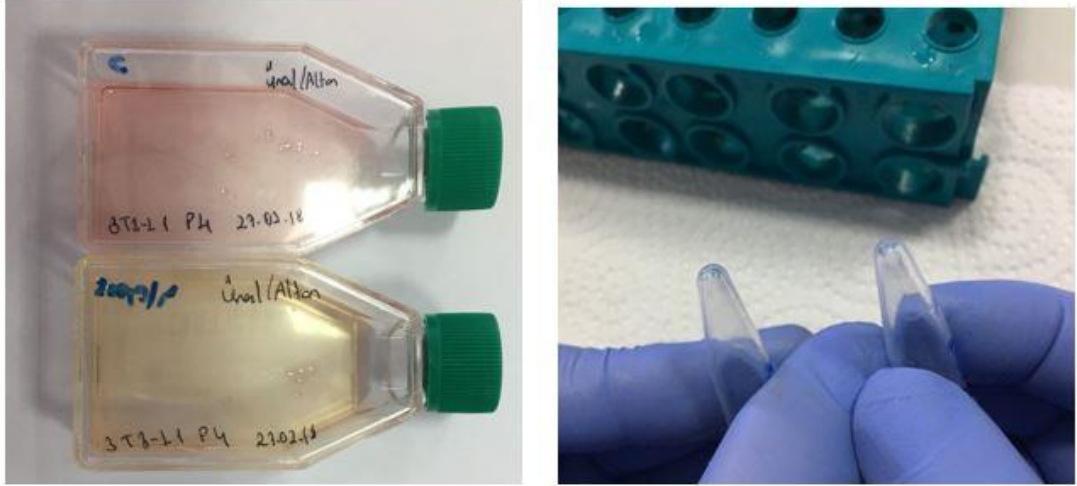


Şekil 3.29. RNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi

Çalışılmaya uygun görülen RNA'lerden cDNA sentezine gidilmiştir.

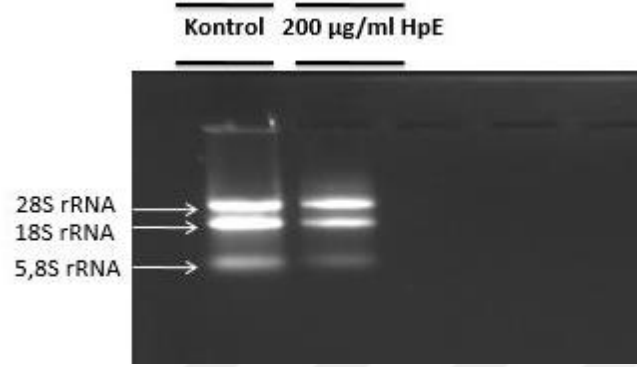
3.3. cDNA örneklerinden primerlerin çalışıp çalışmadığını gözlemlemek için deneme kurulması

Kantitatif PCR denemeleri yapılmadan önce tasarlanan primerlerin istenen şekilde çalışıp çalışmadığını gözlemlemek için primerlerle PCR denemeleri kurulmuştur. Bu ön denemeyi gerçekleştirmek üzere 2 tane 25 cm² flask içinde hücrelerin büyümesi sağlanmıştır. Flasklardan bir tanesine bitki ekstraktı uygulanması sağlanmıştır diğer flasktaki hücreler ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bitki ekstraktı kültür ortamında 200 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. 24 saat sonunda hücrelerin RNA'sının toplanması 1 ml'lik RiboEx protokolü ile sağlanmıştır (Şekil 3.30).



Şekil 3.30. 25 cm'lik flasklardaki hücrelerin dış gözlemi, RNA izolasyonu sonucunda pelletlerin gözlemlenmesi

RNA izolasyonu sonucunda RNA'ların kalitesini belirlemek üzere %1'lik agaroz jelde 75 voltta ve 500 amperde 1 saat yürütülmesi sağlanmıştır. Bunun sonucunda 3 tane rRNA bandı gözlemlenmiştir (Şekil 3.31). Ayrıca miktar ve saflığını ölçmek için spektrofotometrik sonuçlara da bakılmıştır (Çizelge 3.2).

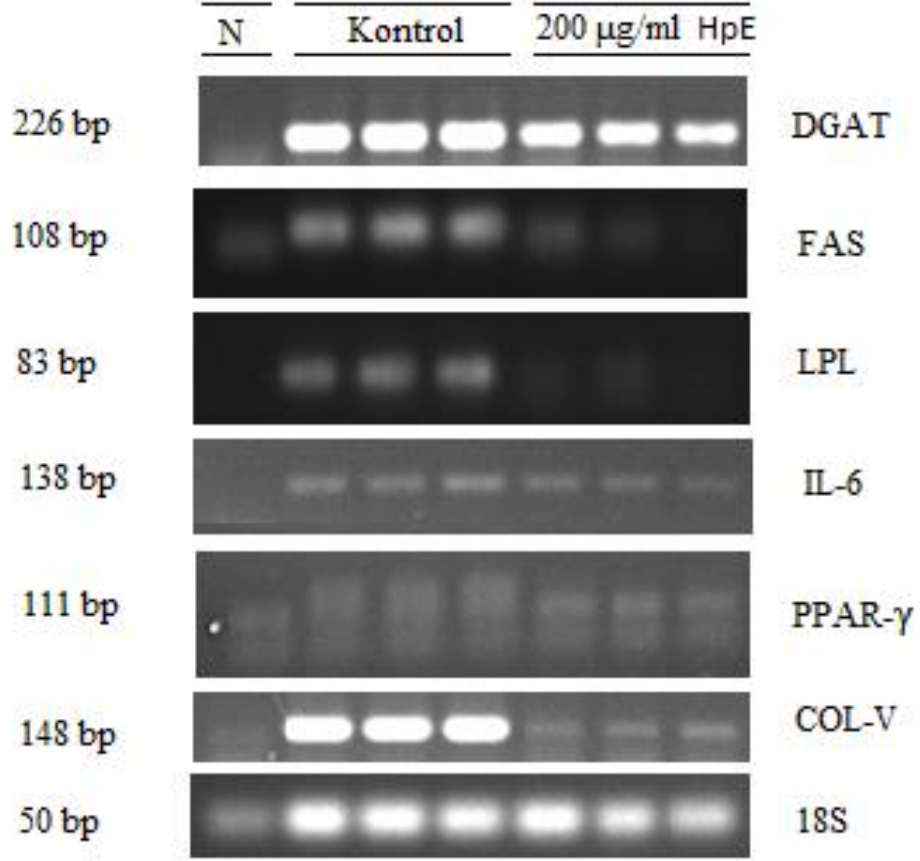


Şekil 3.31. RNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi

Çizelge 3.2. RNA'ların spektrofotometrik analiz sonucu

	Kontrol	200 µg/ml HpE
Konsantrasyon(ng/µl)	882	1613
260/280	2,01	2,08
260/230	1,52	1,81

RNA'ların 200 ng/µL'ye seyreltilmesi sağlanmıştır daha sonra bu RNA'lardan 3.2.5.1.'de verilen protokole göre cDNA sentezine gidilmiştir ve PCR reaksiyonu 3.2.5.2.'deki protokole göre her primer için kurulmuştur. 1 kb'lik DNA ladder kullanarak primerlerin beklenen boyutta amplicon üretip üretmediği belirlenmiştir. Aşağıda primerlerin amplicon boyutları verilmiştir (Şekil 3.32). DGAT, FAS, LPL, IL-6, COL V, PPARg ve 18S beklenen boyutta amplicon oluşturmuşlardır. Elastin ve TNF-a için semi kantitatif RT PCR ile sonuç gözlenememiş bundan dolayı Real Time PCR 'ın daha hassas ve yeni bir metodoloji olduğundan yola çıkarak çözüm olarak bu yöntem ile deneme kurulması planlanmıştır.



Şekil 3.32. Primerlerin PCR sonrası amplicon boyutları

3.4. Real time kantitatif PCR (qPCR) yapılması

3.4.1. qPCR sonrası elde edilen verilerin değerlendirilmesi

qPCR sonucu elde edilen CT değerleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Her örnek grubuna ve primere ait CT değerlerinin gösterilmesi

	18S	DGAT	TNF α	FAS	LPL	COLV	IL-6	PPAR γ	ELASTiN
Nondiferensiyasyon Kontrol	20,17	31,96	27,36	30,42	31,48	34,79	37,46	33,39	34,87
Nondiferensiyasyon Kontrol	20,52	32,47	27,48	30,66	32,09	36,3	38,02	33,47	35,51
Nondiferensiyasyon Kontrol	25,54	32,85	31,93	31,02	32,27	35,5	38,19	34,83	36,5
Nondiferensiyasyon Kontrol	26,02	33,64	31,94	31,31	32,48	-	38,5	35,58	36,83
Diferensiyasyon Kontrol	17,26	24,65	27,44	28,15	22,47	26,23	31,61	30,48	33,32
Diferensiyasyon Kontrol	17,38	24,74	28	28,57	22,62	26,28	32,02	30,73	33,41
Diferensiyasyon Kontrol	19,54	25	31,07	30,28	23,53	30,43	32,04	30,96	35,1
Diferensiyasyon Kontrol	19,61	25,18	31,09	30,59	23,63	29,98	32,19	31,12	35,34
50 μ g/mL HpE-24 saat	17,29	27,87	27,43	30,44	27,5	31,82	29,59	32,01	34,87
50 μ g/mL HpE-24 saat	17,64	28,15	27,49	30,55	27,57	32,31	29,92	32,21	35,6
50 μ g/mL HpE-24 saat	22,96	33,02	32,11	35,42	31,9	32,06	36,84	34,73	36,3
50 μ g/mL HpE-24 saat	23,03	33,26	32,25	-	32,08	-	-	36,95	38,55
100 μ g/mL HpE-24 saat	16,15	29,05	27,46	30,75	28,65	33,7	30,16	33,01	36,82
100 μ g/mL HpE-24 saat	19,08	29,16	27,59	31,06	28,7	32,83	30,32	34,16	37,96
100 μ g/mL HpE-24 saat	21,63	33,61	30,71	31,24	31,58	33,2	37,11	34,45	39,2
100 μ g/mL HpE-24 saat	21,72	33,97	31,21	41,55	31,84	-	38,14	37,92	39,26
150 μ g/mL HpE-24 saat	21,46	33,53	27,34	30,55	31,57	35,2	35,96	34,78	35,09
150 μ g/mL HpE-24 saat	21,5	33,55	27,52	30,56	31,97	36,3	36,49	34,81	36,8
150 μ g/mL HpE-24 saat	28,49	33,87	31,82	30,94	32,75	37,56	36,58	35	36,95
150 μ g/mL HpE-24 saat	28,52	34,31	31,94	31,2	32,9	-	37,88	35,34	39,36
50 μ g/mL HpE-48 saat	18,03	29,49	26,96	30,19	30,49	35,5	29,95	33,02	34,34
50 μ g/mL HpE-48 saat	18,17	29,51	27,19	30,54	30,58	33,85	30,36	33,31	34,96
50 μ g/mL HpE-48 saat	23,42	32,67	31,49	30,82	30,89	34,6	38,49	34,07	38,62
50 μ g/mL HpE-48 saat	23,58	33,65	31,93	30,87	31,05	38,05	38,62	34,13	39,44
100 μ g/mL HpE-48 saat	23,09	31,85	26,51	29,18	28,42	36,2	-	32,6	36,11
100 μ g/mL HpE-48 saat	23,36	32,01	26,55	29,45	30,9	-	35,41	32,95	36,7

Çizelge 3.3. Her örnek grubuna ve primere ait CT değerlerinin gösterilmesi (devamı)

	18S	DGAT	TNF α	FAS	LPL	COLV	IL-6	PPAR γ	ELASTİN
100 μ g/mL HpE-48 saat	29,68	33,99	32,03	31,27	31,2	-	36,17	34,62	37,43
100 μ g/mL HpE-48 saat	29,73	35,13	32,14	31,34	32,36	-	36,49	35,66	36,03
150 μ g/mL HpE-48 saat	24,65	32,43	26,78	29,61	30,1	-	36,01	33,72	36,14
150 μ g/mL HpE-48 saat	24,88	32,97	27,25	29,86	31,19	-	36,82	33,86	36,9
150 μ g/mL HpE-48 saat	28,5	34,37	32,14	31,12	31,47	36,81	37,14	33,88	36,21
150 μ g/mL HpE-48 saat	29,2	34,4	32,38	31,63	31,5	38,17	37,75	34,88	36
Negatif Kontrol	29,94	35,82	-	42,31	32,14	37,27	37,71	34,7	35,96

Yukarıda verilen CT değerlerinin uygunluğu negatif kontrole göre belirlenmiştir. CT değeri negatif kontrol değerinden yüksek olanlar değerlendirilirken negatif olarak kabul edilmiştir ve grafik oluştururken bu değerler kullanılmamıştır.

3.4.1.1. DGAT geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Kantitatif Real-Time PCR sonucu elde edilen CT değerleri, değerlendirilirken her örnek grubu için iki teknik, iki biyolojik tekrar kullanılarak toplam dört örneğin CT değerleri kullanılmıştır. Grafik oluşturabilmek için bu değerlerin ortalaması, standart sapması ve standart hatası hesaplanmıştır (Çizelge 3.4). Aynı şekilde deneyi gerçekleştirilen 18S geni bağıl mRNA ekspresyonunu hesaplamada normalizasyon için kullanılmıştır (Çizelge 3.5). Tüm genler aynı koşullar altında elde edilen cDNA'lar ile çalışılmıştır.

Çizelge 3.4. DGAT geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması

	ND Kontrol	D Kontrol	50-24 HpE	100-24 HpE	150-24 HpE	50-48 HpE	100-48 HpE	150-48 HpE
1	31,96	24,65	27,87	29,05	33,53	29,49	31,85	32,43
2	32,47	24,74	28,15	29,16	33,55	29,51	32,01	32,97
3	32,85	25	33,02	33,61	33,87	32,67	33,99	34,37
4	33,64	25,18	33,26	33,97	34,31	33,65	35,13	34,4
ORT	32,73	24,8925	30,575	31,4475	33,815	31,33	33,245	33,5425
SD	0,7078135	0,242401	2,9656309	2,709248 1	0,364920083	2,150658 8	1,58949677	0,99757622 9
SEM	0,3539067	0,121201	1,4828155	1,354624	0,182460041	1,075329 4	0,79474838	0,49878811 5

Çizelge 3.5. 18S geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması

	ND Kontrol	D Kontrol	50-24 HpE	100-24 HpE	150-24 HpE	50-48 HpE	100-48 HpE	150-48 HpE
1	20,17	17,26	17,29	16,15	21,46	18,03	23,09	24,65
2	20,52	17,38	17,64	19,08	21,5	18,17	23,36	24,88
3	25,54	19,54	22,96	21,63	28,49	23,42	29,68	28,5
4	26,02	19,61	23,03	21,72	28,52	23,58	29,73	29,2
ORT	23,0625	18,4475	20,23	19,645	24,9925	20,8	26,465	26,8075
SD	3,1472567	1,30316	3,19607 0	2,631862 5	4,05593700	3,118899	3,74290885	2,37758105 4
SEM	1,5736283	0,65158	1,59803 5	1,315931 2	2,02796850 3	1,559449 7	1,87145442 5	1,18879052 7

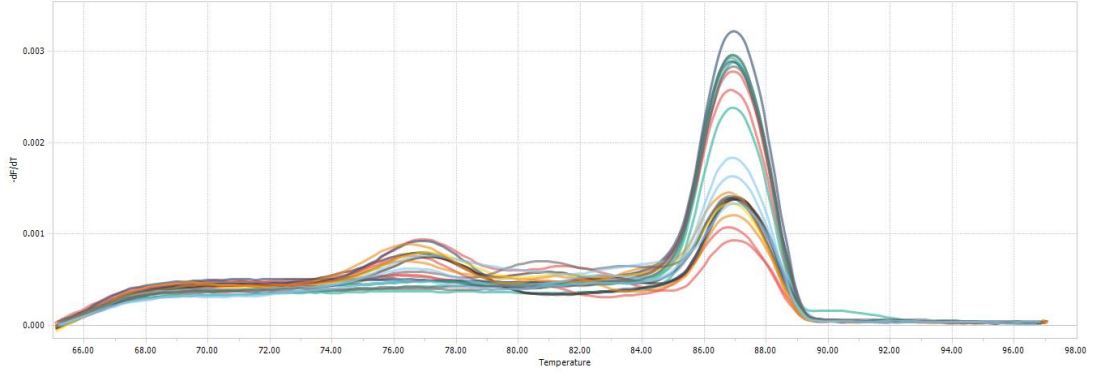
18S için verilen değerler tüm genlerin bağıl mRNA ekspresyonunu hesaplamada Çizelge 3.5’de olduğu gibi kullanılmıştır.

DGAT için CT hesaplama 2.2.8.’de verildiği gibi yapılmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. DGAT geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi

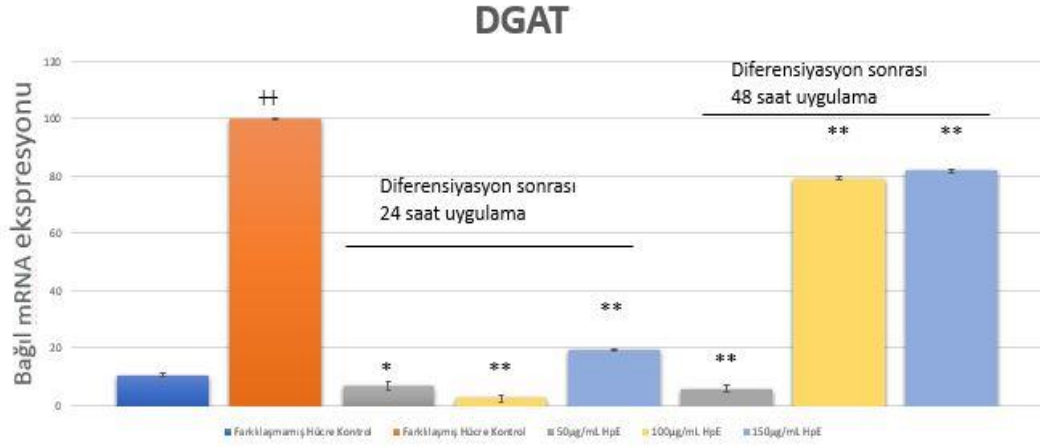
ÖRNEK	Hedef gen CT	18S CT	ΔCT	$2^{(-\Delta CT)}$	D.K.'ye göre Oran	Yüzde Oran
Nondiferensiyasyon K	32,73	23,0625	9,6675	0,00123	0,107134868	10,71349
Diferensiyasyon K	24,8925	18,4475	6,445	0,011478	1	100
50-24 HpE	30,575	20,23	10,345	0,000769	0,066985841	6,698584
100-24 HpE	31,4475	19,645	11,8025	0,00028	0,024391123	2,439112
150-24 HpE	33,815	24,9925	8,8225	0,002209	0,192442586	19,24426
50-48 HpE	31,33	20,8	10,53	0,000676	0,058924033	5,892403
100-48 HpE	33,245	26,465	6,78	0,009099	0,792784137	79,27841
150-48 HpE	33,5425	26,8075	6,735	0,009388	0,817902059	81,79021

Erime eğrisi gözlemi sonucu elde edilen tüm piklerin aynı zamanda olduğu, farklı DNA ve primer dimeri kontaminasyonundan kaynaklı pik eldesi olmadığına karar verilmiştir (Şekil 3.33).



Şekil 3.33. DGAT erime eğrisi grafiği

Elde edilen oranlarla grafik oluşturulmuştur. Oluşturulan grafikteki değerler One way ANOVA-PostHoc-Tukey metoduna göre değerlendirilmiş ve istatistiki olarak anlamlılığı kıyaslanmıştır. Artan dozlarda *H.perforatum* uygulanmış olan 3T3-L1 hücrelerinden elde edilen cDNA'larla yapılan bu çalışmada 3T3-L1 preadipositlerine göre (farklılaşmamış hücre kontrol grubu) 3T3-L1 adipositlerinin DGAT ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Adiposit hücrelerine farklı dozlarda *H.perforatum* uygulanması adiposite ile birlikte gelişen DGAT ekspresyonunun downregüle olmasını sağlamıştır. İstatistiki olarak değerlendirildiğinde bu downregülasyonun anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 3.34).



Şekil 3.34. DGAT geninin bağıl mRNA ekspresyonu

** , farklılaşmış hücre ile kıyaslandığında, $p < 0,001$ değerini gösterir.

†† , farklılaşmamış hücre kontrol grubu ile kıyaslandığında $p < 0,001$ değerini gösterir.

* , farklılaşmış hücre ile kıyaslandığında, $p < 0,05$ değerini gösterir.

3.4.1.2. LPL geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

LPL geni için qPCR sonrasında her örnek grubu için CT değerleri alınmıştır ve bu değerlerin ortalamasının, standart hatasının ve standart sapmasının hesaplanması sağlanmıştır (Çizelge 3.7). Housekeeping olarak kullanılan 18S geninin aynı örneklerinde aynı hesaplama yapılmıştır (Çizelge 3.5)

Çizelge 3.7. LPL geninin CT değerleri

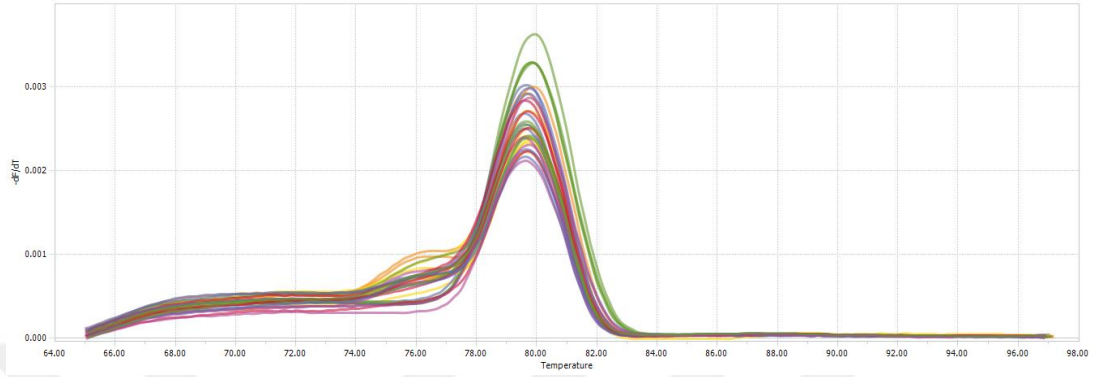
LPL								
	ND-Kontrol	D-Kontrol	50-24 HpE	100-24 HpE	150-24 HpE	50-48 HpE	100-48 HpE	150-48 HpE
1	31,48	22,47	27,5	28,65	31,57	30,49	28,42	30,1
2	32,09	22,62	27,57	28,7	31,97	30,58	30,9	31,19
3	32,27	23,53	31,9	31,58	32,75	30,89	31,2	31,47
4	32,48	23,63	32,08	31,84	32,9	31,05	32,36	31,5
OR T	32,08	23,0625	29,7625	30,1925	32,2975	30,7525	30,72	31,065
SD	0,430581	0,602073	2,5733036	1,7555887	0,633581092	0,262091	1,65754839	0,658305907
SE M	0,2152905	0,301036	1,2866518	0,8777943	0,316790546	0,1310455	0,828774195	0,329152953

Elde edilen veriler değerlendirilirken $2^{(-\Delta CT)}$ metodu kullanılmıştır. LPL geni 18S'e göre normalize edilmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi

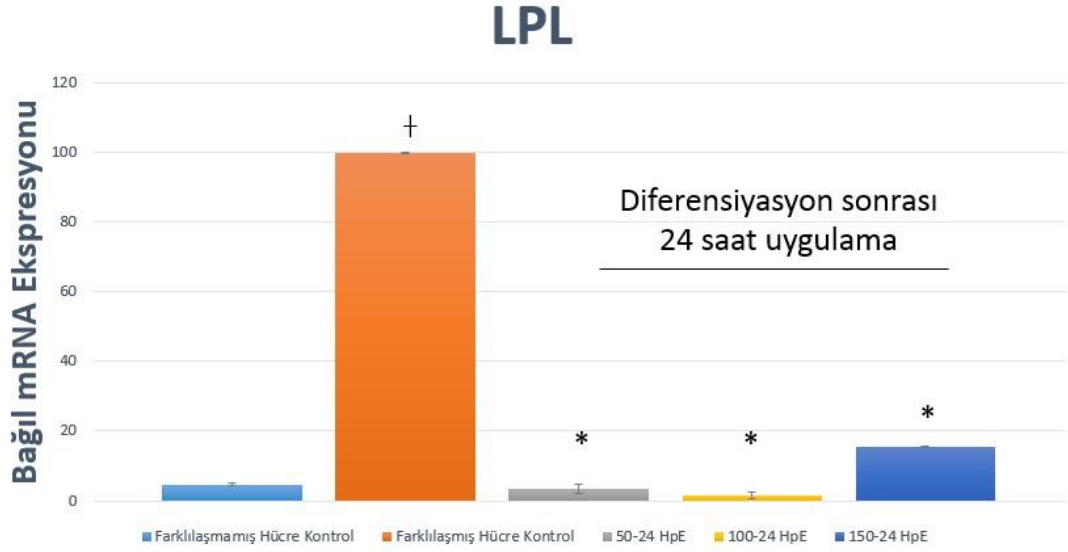
ÖRNEK	Hedef gen	18s CT	ΔCT	$2^{(-\Delta CT)}$	DM'e göre Oran	Yüzde
Farklılaşmamış Kontrol (ND-K)	Hücre	32,08	23,0625	9,0175	0,00193	4,728413
Farklılaşmış Kontrol (D-K)	Hücre	23,0625	18,4475	4,615	0,040808	100
50-24 HpE		29,7625	20,23	9,5325	0,00135	3,30891
100-24 HpE		30,1925	19,645	10,5475	0,000668	1,637343
150-24 HpE		32,2975	24,9925	7,305	0,006324	15,49635
50-48 HpE		30,7525	20,8	9,9525	0,001009	2,473161
100-48 HpE		30,72	26,465	4,255	0,052374	128,3426
150-48 HpE		31,065	26,8075	4,2575	0,052284	128,1204

Elde edilen CT değerlerinde farklı DNA'ların ya da primer dimerlerinin etkisinin olmadığını göstermek adına erime eğrisi grafiğine bakılmıştır. Melting piklerinin aynı sıcaklıkta olması CT değerlerinin tek amplikondan gelen floresan ışımaya elde edildiğini göstermektedir (Şekil 3.35).



Şekil 3.35. LPL erime eğrisi grafiği

Uygun görülen örnek gruplarının CT değerlerinden elde edilen grafikte diferensiyasyonla artan LPL ekspresyonunun *Hypericum perforatum* ekstraktlarının farklı dozlarda ve farklı zamanlarda uygulanması ile düştüğü ve preadipositlerin ekspresyon seviyesiyle ekstrakt uygulanmış adipositlerin LPL ekspresyonunun birbirine yakın seyrettiği görülmüştür. Bu downregulation istatistiki olarak değerlendirildiğinde anlamlı olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 3.36).



Şekil 3.36. LPL bağıl mRNA ekspresyonu

* , farklılaşmış hücre ile kıyaslandığında, $p < 0,05$ değerini gösterir.

† , farklılaşmamış hücre kontrol grubu ile kıyaslandığında $p < 0,05$ değerini gösterir.

3.4.1.3. TNF- α geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

TNF- α geni qPCR sonrası elde edilen CT değerleri göz önüne alındığında tüm gruplardan elde edilen değerlerin birbirine yakın olduğu görülmektedir. TNF- α için bağıl mRNA ekspresyonu grafiği oluşturmak adına hesaplamalar yapılmıştır (Çizelge 3.9, 3.10).

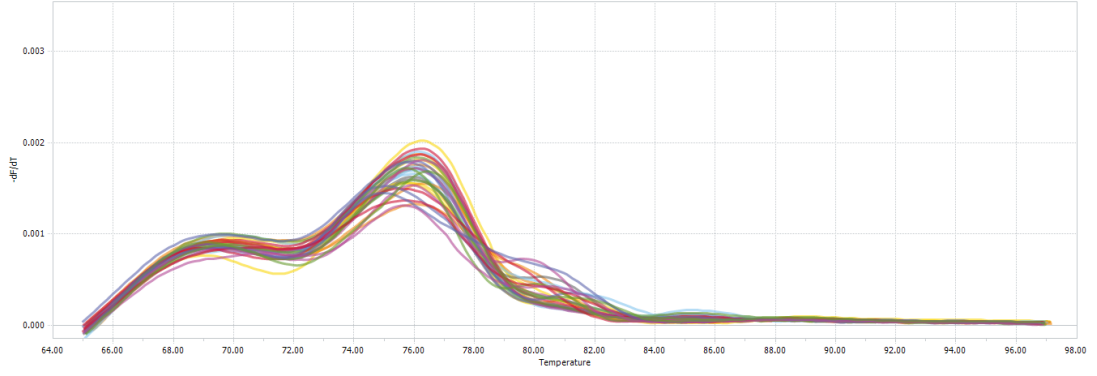
Çizelge 3.9. TNF- α geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması

TNF- α								
	ND	D	50-24	100-24	150-24	50-48	100-48	150-48
	Kontrol	Kontrol	HpE	HpE	HpE	HpE	HpE	HpE
1	27,36	27,44	27,43	27,46	27,34	26,96	26,51	26,78
2	27,48	28	27,49	27,59	27,52	27,19	26,55	27,25
3	31,93	31,07	32,11	30,71	31,82	31,49	32,03	32,14
4	31,94	31,09	32,25	31,21	31,94	31,93	32,14	32,38
ORT	29,6775	29,4	29,82	29,2425	29,655	29,3925	29,3075	29,6375
SD	2,607199	1,95333	2,72580	1,99438	2,5707262	2,68368	3,2075366	3,0358565
	97	9	26	17	27	37	98	51
SEM	1,303599	0,97667	1,36290	0,99719	1,2853631	1,34184	1,6037683	1,5179282
	98		13	08	13	19	49	76

Çizelge 3.10. TNF-a geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi

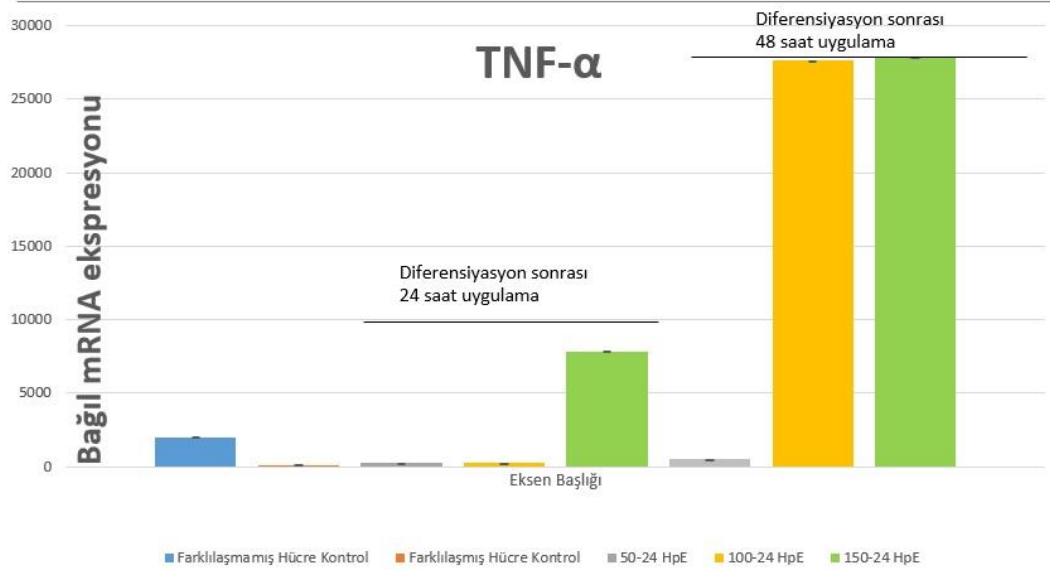
ÖRNEK	Hedef gen	18s CT	ΔCT	$2^{(-\Delta CT)}$	DM'e göre Oran	Yüzde	
Farklılaşmamış Kontrol	Hücre	29,6775	23,0625	6,615	0,010202	20,21704	2021,704
Farklılaşmış Kontrol	Hücre	29,4	18,4475	10,9525	0,000505	1	100
50-24 HpE		29,82	20,23	9,59	0,001298	2,571304	257,1304
100-24 HpE		29,2425	19,645	9,5975	0,001291	2,557971	255,7971
150-24 HpE		29,655	24,9925	4,6625	0,039486	78,24898	7824,898
50-48 HpE		29,3925	20,8	8,5925	0,002591	5,133704	513,3704
100-48 HpE		29,3075	26,465	2,8425	0,139419	276,2824	27628,24
150-48 HpE		29,6375	26,8075	2,83	0,140632	278,6866	27868,66

TNF- α için erime eğrisi grafiği verilmiştir (Şekil 3.37).



Şekil 3.37. TNF- α erime eğrisi grafiği

Elde edilen CT değerleri ve istatistiksel analiz sonrasında TNF- α geninin ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Daha önce obezite ile ilgili yapılan *in vivo* çalışmalarda olduğu gibi hücre kültürü çalışmalarında TNF- α için anlamlı bir değişiklik olmaması beklendik bir durumdur. TNF- α büyük adipositler tarafından hücre dışına salgılanır ve inflamasyon durumunda ortaya çıkar. Hücresel anlamda, *in vivo* çalışmalarda olduğu gibi bütün bir vücut sistemi üzerinde değil de belirli özelliğe sahip hücrelerle çalışıldığı için inflamasyon etkisini net bir şekilde göremememiz beklenen bir durumdur. Veriler ışığında grafik oluşturulmuş, ancak grafikteki artış ve azalışlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.38).



Şekil 3.38. TNF- α bağıl mRNA ekspresyonu

3.4.1.4. FAS geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

qPCR sonrası FAS geninden elde edilen CT değerleri doğrultusunda hesaplamalar yapılmıştır (Çizelge 3.11, 3.12).

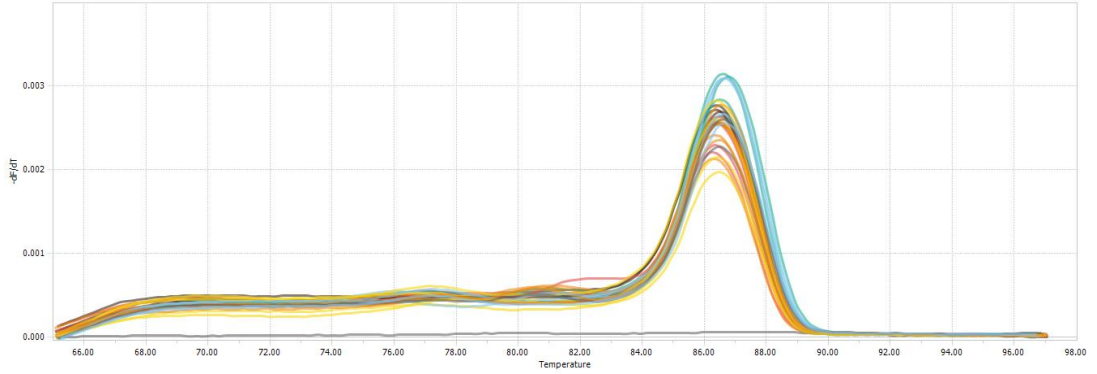
Çizelge 3.11. FAS geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması

FAS								
	ND	D	50-24	100-24	150-24	50-48	100-48	150-48
	Kontrol	Kontrol	HpE	HpE	HpE	HpE	HpE	HpE
1	30,42	28,15	30,44	30,75	30,55	30,19	29,18	29,61
2	30,66	28,57	30,55	31,06	30,56	30,54	29,45	29,86
3	31,02	30,28	35,42	31,24	30,94	30,82	31,27	31,12
4	31,31	30,59	32,13	41,55	31,2	30,87	31,34	31,63
ORT	30,8525	29,3975	32,135	33,65	30,8125	30,605	30,31	30,555
SD	0,392205	1,21680	2,322103	5,270553	0,3157398	0,312463	1,1545561	0,9748333
	3	9	9	4	72	3	92	19
SEM	0,392205	1,21680	2,322103	5,270553	0,3157398	0,312463	1,1545561	0,9748333
	3	9	9	4	72	3	92	19

Çizelge 3.12. FAS geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi

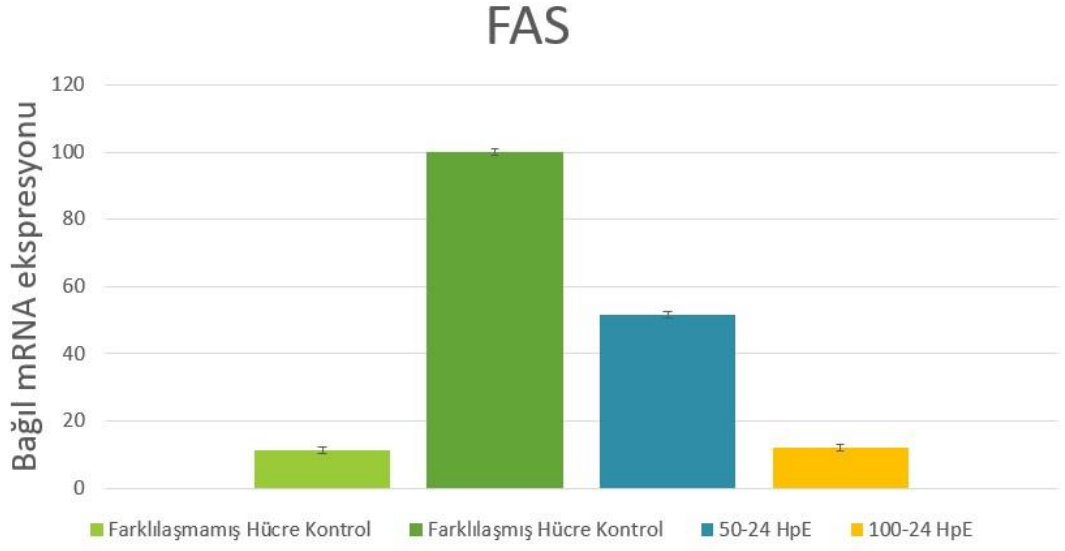
ÖRNEK	Hedef gen	18s CT	ΔCT	$2^{(-\Delta CT)}$	DM'e göre Oran	Yüzde	
Farklılaşmamış Kontrol	Hücre	30,8525	23,0625	7,79	0,004518	0,111878	11,18781
Farklılaşmış Kontrol	Hücre	29,3975	18,4475	10,95	0,000506	1	100
50-24 HpE		32,135	20,23	11,905	0,000261	0,515842	51,58416
100-24 HpE		33,65	19,645	14,005	6,08E-05	0,120324	12,03243
150-24 HpE		30,8125	24,9925	5,82	0,017701	35,0174	3501,74
50-48 HpE		30,605	20,8	9,805	0,001118	2,211461	221,1461
100-48 HpE		30,31	26,465	3,845	0,069589	137,6633	13766,33
150-48 HpE		30,555	26,8075	3,7475	0,074454	147,2884	14728,84

FAS geni için elde edilen erime eğrisi grafiğinde tek sıcaklıkta pik olması bize kontaminasyon olmadığını göstermektedir (Şekil 3.39).



Şekil 3.39. FAS geni erime eğrisi grafiği

Elde edilen verilerin doğrultusunda uygun bulunan örneklerle oluşturulan grafikte FAS geninin adiposite dönüşüm sonrası ekspresyonunun arttığı artan ekspresyonun *Hypericum perforatum* ile inhibe edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.40). Ancak bu veriler istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.40. FAS geninin bağıl mRNA ekspresyonu

3.4.1.5. Col-V geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Col-V için qPCR sonrası elde edilen CT değerleri aşağıdaki çizelelerde verilmiştir (Çizelge 3.13, 3.14).

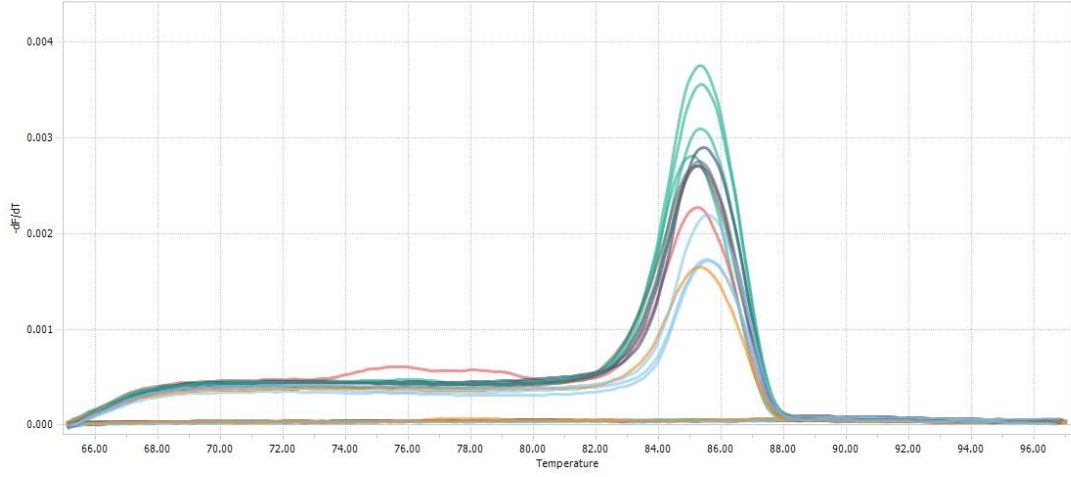
Çizelge 3.13. Col-V geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması

COLV						
	ND Kontrol	D Kontrol	50-24 HpE	100-24 HpE	150-24 HpE	50-48 HpE
1	34,79	26,23	31,82	33,7	35,2	35,5
2	36,3	26,28	32,31	32,83	36,3	33,85
3	35,5	30,43	32,065	33,2	37,56	38,05
ORT	35,53	27,64667	32,065	33,243333	36,35333333	35,8
SD	0,75544689	2,410567	0,245	0,4366158	1,180903609	2,1160104
SEM	0,43615746	1,391742	0,1414508	0,2520802	0,681795016	1,2216792

Çizelge 3.14. COL-V geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi

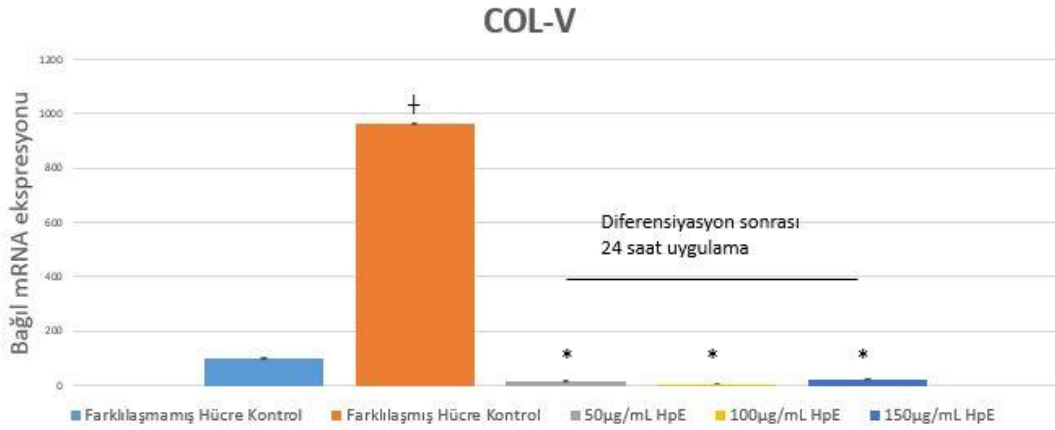
ÖRNEK	Hedef	gen	18s CT	ΔCT	$2^{(-\Delta CT)}$	Oran	Yüzde
Farklılaşmamış Kontrol	Hücre	35,53	23,0625	12,4675	0,000177	1	100
Farklılaşmış Kontrol	Hücre	27,64666667	18,4475	9,199167	0,001701	9,635325025	963,5325
50-24 HpE		32,065	20,23	11,835	0,000274	0,160892242	16,08922
100-24 HpE		33,24333333	19,645	13,59833	8,06E-05	0,04739351	4,739351
150-24 HpE		36,35333333	24,9925	11,36083	0,00038	0,223497924	22,34979
50-48 HpE		35,8	20,8	15	3,05E-05	0,017938047	1,793805

Col-V için erime eğrisi grafiği aşağıda verilen gibidir (Şekil 3.41). Bu grafiğe bakılarak SYBR-Green boyasının verdiği floresan boyanın tek amplikondan kaynaklandığı görülmektedir.



Şekil 3.41. Col-V erime eğrisi grafiği

Elde edilen CT değerlerinden uygun bulunanlar 18S ile normalize edilerek bağıl mRNA ekspresyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.42). Adipositeyle artan Col-V değerinin *Hypericum perforatum* uygulaması ile downregüle edildiği ve bu downregülasyonun istatistiki olarak anlamlı olduğu ortaya konulmuştur.



Şekil 3.42. Col-V bağıl mRNA ekspresyonu grafiği

* , farklılaşmış hücre ile kıyaslandığında, $p < 0.05$ değerini gösterir.

† , farklılaşmamış hücre kontrol grubu ile kıyaslandığında $p < 0,05$ değerini gösterir.

3.4.1.6. IL-6 geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

IL-6 geni için kantitatif PCR sonrası elde edilen CT değerlerinden bağıl mRNA ekspresyonu hesaplanmıştır (Çizelge 3.15, 3.16).

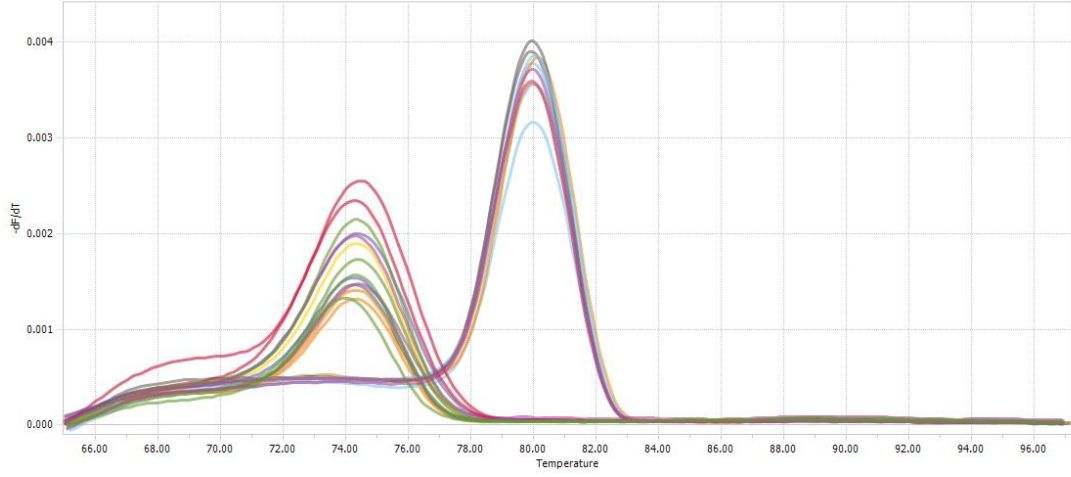
Çizelge 3.15. IL-6 geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması

IL-6								
	ND Kontrol	D Kontrol	50-24 HpE	100-24 HpE	150-24 HpE	50-48 HpE	100-48 HpE	150-48 HpE
1	37,46	31,61	29,59	30,16	35,96	29,95	36,02	36,01
2	38,02	32,02	29,92	30,32	36,49	30,36	35,41	36,82
3	38,19	32,04	36,84	37,11	36,58	38,49	36,17	37,14
4	38,5	32,19	32,1	38,14	37,88	38,62	36,49	37,75
ORT	38,0425	31,965	32,1125	33,9325	36,7275	34,355	36,0225	36,93
SD	0,43622433	0,248529	3,3426275	4,2849144	0,815572396	4,8529201	0,452944073	0,724568837
SEM	0,87244866	0,497058	6,6852549	8,5698289	1,631144792	9,7058402	0,905888146	1,449137675

Çizelge 3.16. IL-6 geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi

ÖRNEK	Hedef gen	18s CT	ΔCT	$2^{(-\Delta CT)}$	DM'e göre Oran	Yüzde	
Farklılaşmamış Kontrol	Hücre	38,0425	23,0625	14,98	3,09E-05	0,362864	36,28638
Farklılaşmış Kontrol	Hücre	31,965	18,4475	13,5175	8,53E-05	1	100
50-24 HpE		32,1125	20,23	11,8825	0,000265	3,105876	310,5876
100-24 HpE		33,9325	19,645	14,2875	5E-05	0,586417	58,64175
150-24 HpE		36,7275	24,9925	11,735	0,000293	3,440218	344,0218
50-48 HpE		34,355	20,8	13,555	8,31E-05	0,974342	97,43419
100-48 HpE		36,0225	26,465	9,5575	0,001327	15,56248	1556,248
150-48 HpE		36,93	26,8075	10,1225	0,000897	10,51954	1051,954

IL-6 geni için erime eğrisi grafiği incelendiğinde iki farklı sıcaklıkta pik verdiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin primer tasarımından kaynaklı olduğu düşünülmüştür (Şekil 3.43). Primerlerin çalışıp çalışmadığını gözlemek için semikantitatif analizi yapıldığında IL-6 primerinin iki ampikon ürettiği ön çalışmamızda gözlemlenmiştir. İki farklı noktada melting piki vermesi bunu kanıtlar niteliktedir. Primer çalışmaya uygun bulunmadığı için elde edilen verilerin kullanılmamasına karar verilmiştir. İleriki çalışmalarda inflamasyon belirteci olarak kullanılmak üzere farklı moleküler markerlar taranarak primer tasarlanabilir ya da IL-6'nın primer tasarımı yeniden gözden geçirilip tekrar tasarlanması sağlanabilir.



Şekil 3.43. IL-6 erime eğrisi grafiği

3.4.1.7. PPAR- γ geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

PPAR- γ geni için qPCR sonrası elde edilen CT değerleri $2^{-\Delta CT}$ metoduna göre değerlendirilmiş ve 18S ile normalizasyonu sağlanmıştır. Hesaplamalar aşağıda verilen çizelgelere göre yapılmıştır (Çizelge 3.17, 3.18).

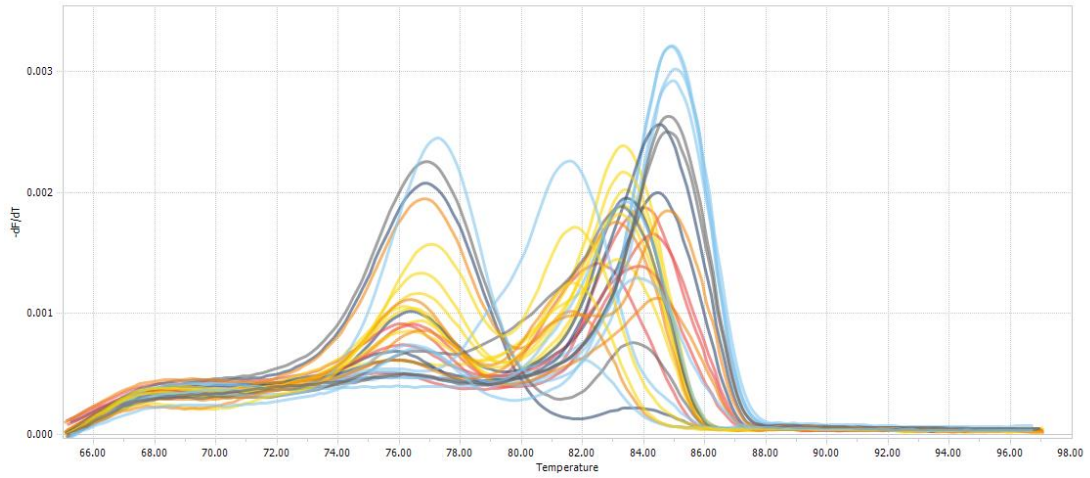
Çizelge 3.17. PPAR- γ geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması

PPAR γ								
	ND Kontrol	D Kontrol	50-24 HpE	100-24 HpE	150-24 HpE	50-48 HpE	100-48 HpE	150-48 HpE
	33,39	30,48	32,01	33,01	34,78	33,02	32,6	33,72
	33,47	30,73	32,21	34,16	34,81	33,31	32,95	33,86
	34,83	30,96	34,73	34,45	35	34,07	34,62	33,88
	35,58	31,12	36,95	37,92	35,34	34,13	35,66	34,88
ORT	34,3175	30,8225	33,975	34,885	34,9825	33,6325	33,9575	34,085
SD	1,070058	0,27885	2,337883	2,116734	0,2574716	0,553195	1,4370426	0,5347585
	41	2	7	9	81	3	81	12
SEM	2,140116	0,55770	4,675767	4,233469	0,5149433	1,106390	2,8740853	1,0695170
	82	4	3	8	63	5	62	25

Çizelge 3.18. PPAR- γ geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi

ÖRNEK	Hedef gen CT	18s CT	ΔCT	$2^{(-\Delta CT)}$	Oran	DM'e göre Oran	Yüzde	GM oran
Farklılaşmamış Hücre Kontrol	34,3175	23,062 5	11,255	0,00040 9	1	0,46009 4	46,0093 8	100
Farklılaşmış Hücre Kontrol	30,8225	18,447 5	12,375	0,00018 8	0,4600938 25	1	100	46,0093 8
50-24 HpE	33,975	20,23	13,745	7,28E- 05	0,1780062 74	0,17800 6	17,8006 3	17,8006 3
100-24 HpE	34,885	19,645	15,24	2,58E- 05	0,0631532 15	0,13726 2	13,7261 6	6,31532 2
150-24 HpE	34,9825	24,992 5	9,99	0,00098 3	2,4032720 99	5,22343 9	522,343 9	240,327 2
50-48 HpE	33,6325	20,8	12,832 5	0,00013 7	0,3350620 04	0,72824 7	72,8247 1	33,5062
100-48 HpE	33,9575	26,465	7,4925	0,00555 3	13,571422 12	29,4970 8	2949,70 8	1357,14 2
150-48 HpE	34,085	26,807 5	7,2775	0,00644 5	15,752402 77	34,2373 7	3423,73 7	1575,24

PPAR- γ için elde edilen erime eğrisi grafiği aşağıda verilmiştir (Şekil 3.44).



Şekil 3.44. PPAR- γ erime eğrisi grafiği

Erime eğrisi grafiğinde çok fazla noktada pik gözlemlenmektedir bu farklı boyutlarda amplikonların floresan ışınmasıyla elde edilen piklerdir. Bu durumda primer tasarımıyla ilgili sorun olduğu söylenebilir. Bunu gidermek için insülin duyarlılığıyla ilgili yeni moleküler markerlar taranabilir ya da PPAR- γ 'nın tekrar tasarımının yapılması sağlanabilir.

3.4.1.8. Elastin geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Elastin geni için qPCR sonrası elde edilen CT değerleri ve bu değerlerin 18S'le bağlı olacak şekilde hesaplanması aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 3.19, 3.20). Elastinin tüm CT değerleri birbirine yakın seyretmektedir, o yüzden elde edilen veriler değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç ortaya çıkmamıştır.

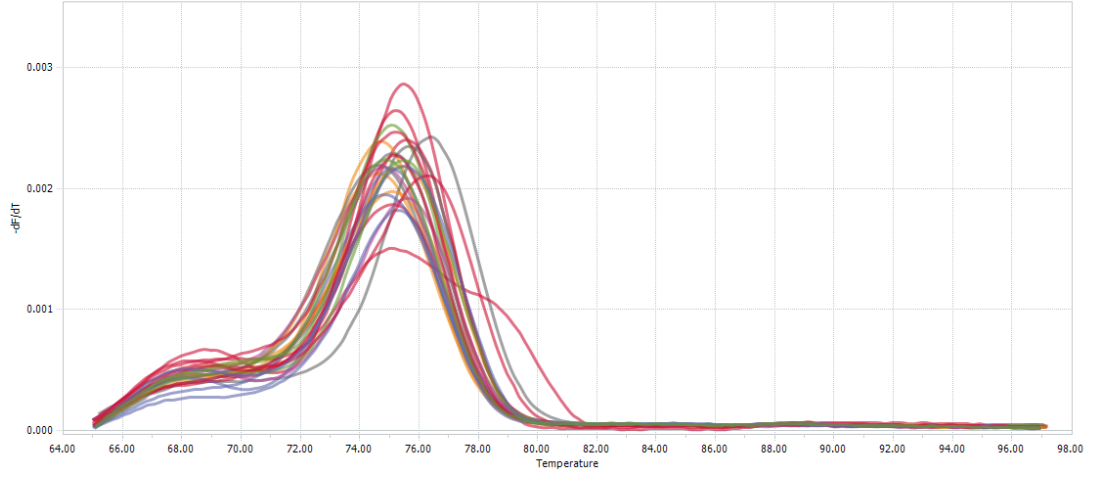
Çizelge 3.19. Elastin geninde denenen örneklerin ortalamasının, standart sapmasının ve standart hatasının hesaplanması

Elastin								
	ND Kontrol	D Kontrol	50-24 HpE	100-24 HpE	150-24 HpE	50-48 HpE	100-48 HpE	150-48 HpE
1	34,87	33,32	34,87	36,82	35,09	34,34	36,11	36,14
2	35,51	33,41	35,6	37,96	36,8	34,96	36,7	36,9
3	36,5	35,1	36,3	39,2	36,95	38,62	37,43	36,21
4	36,83	35,34	38,55	39,26	39,36	39,44	36,03	36
ORT	35,9275	34,292 5	36,33	38,31	37,05	36,84	36,5675	36,3125
SD	0,900902 33	1,0760 85	1,59099 55	1,16005 75	1,7559612 75	2,56338 32	0,6479904 83	0,4012792 05
SEM	1,801804 65	2,1521 69	3,18199 1	2,32011 49	3,5119225 5	5,12676 64	1,2959809 67	0,8025584 09

Çizelge 3.20. Elastin geninin $2^{(-\Delta CT)}$ metoduna göre CT değerlerinin değerlendirilmesi

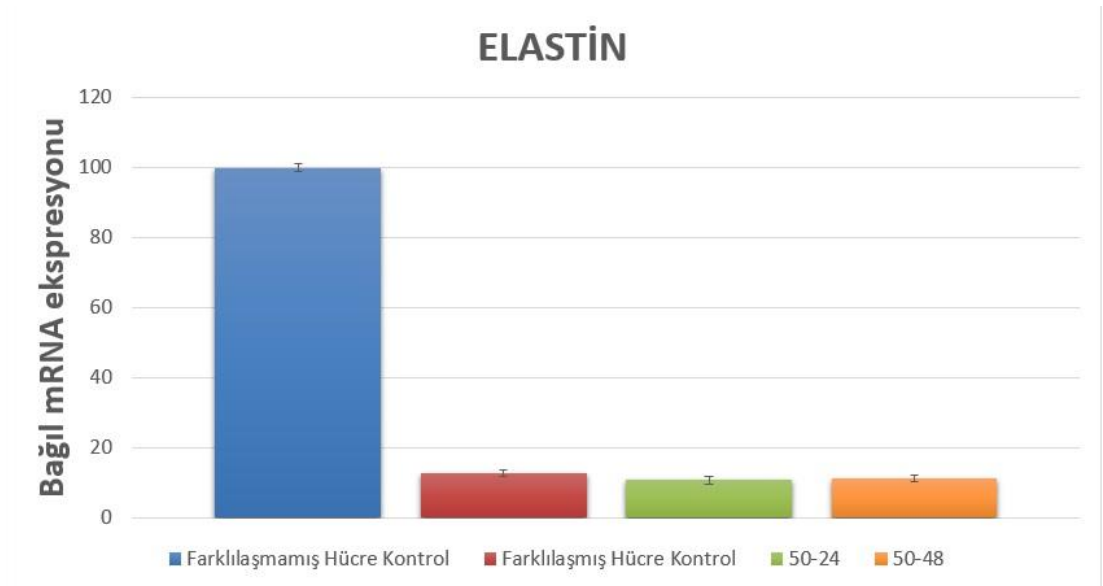
ÖRNEK	Hedef gen CT	18s CT	ΔCT	$2^{(-\Delta CT)}$	GM'e göre Oran	Yüzde(gm)
Farklılaşmamış Kontrol	Hücre 35,9275	23,0625	12,865	0,000134	1	100
Farklılaşmış Kontrol	Hücre 34,2925	18,4475	15,845	1,7E-05	0,126744935	12,67449
50-24	36,33	20,23	16,1	1,42E-05	0,106210625	10,62106
100-24	38,31	19,645	18,665	2,41E-06	0,017948412	1,794841
150-24	37,05	24,9925	12,0575	0,000235	1,750175989	175,0176
50-48	36,84	20,8	16,04	1,48E-05	0,11072094	11,07209
100-48	36,5675	26,465	10,1025	0,00091	6,785711058	678,5711
150-48	36,3125	26,8075	9,505	0,001376	10,26740718	1026,741

Elastinin erime eğrisi grafiği aşağıdaki şekilde gibidir (Şekil 3.45). Tek bir sıcaklık değerinde pik vermiştir.



Şekil 3.45. Elastin erime eğrisi grafiği

Elastin için bağıl mRNA ekspresyonu değerlendirildiğinde farklılaşmamış hücrelerde yüksek olan mRNA ekspresyonunun diferansiye olan hücrelerde düştüğü gözlemlenmiştir (Şekil 3.46). *Hypericum perforatum* uygulamasının bu deneme için downregülasyonu tolere edemediği gözlemlenmiştir.



Şekil 3.46. Elastin bağıl mRNA ekspresyon grafiği

3.4. Tartışma

Obezite ve buna bağlı olarak ortaya çıkan insülin direnci, diyabet gibi hastalıkların prevalansı tüm dünyada giderek artmaktadır. Diyabetin tedavisi için oral hipoglisemik ajanlar ve insülin gibi halihazırda tedavi seçenekleri mevcuttur. Obezite için ise diyetle birlikte glisemik indeksi düşürücü ilaçlar kullanılmaktadır. Ayrıca BKİ ≥ 40 bireyler için ise metabolik cerrahi önerilmektedir. Metabolik cerrahi sonrasında hastalar için birçok şikayetten söz edilebilir. Sürekli bulantı, kusma ve bağırsak sorunları bu şikayetlerin başında gelmektedir. Metabolik cerrahi ve ilaç kullanımı her birey için tolere edilebilir değildir. Ayrıca obezite ve obeziteye bağlı hastalıkların tedavisi ülkelerin ekonomisine büyük zarar vermektedir. Bu sebeple araştırmacılar alternatif yollar aramaktadır. Alternatif yolların büyük kısmını tıbbi bitkiler oluşturmaktadır.

H.perforatum'un antiobezite ve antidiyabetik etkisi farelerde ve hücre hatlarıyla yapılan denemelerde ortaya konulmuştur (Amini vd., 2009; Husain vd., 2011; Tian vd., 2015).

Obezite, Tip II diyabet, hipertansiyon, ateroskleroz, yağlı karaciğer, kanser, astım ve uyku apnesi gibi birkaç kronik hastalığın patogenezinde rol oynayan kronik ve düşük dereceli bir inflamasyon durumudur (Ye, 2013). İnflamasyon, yüksek sayıda beyaz kan hücresi veya dolaşımdaki ve dokudaki artmış pro-inflamatuar sitokin seviyeleri ile karakterize fizyolojik bir işlemdir. Genel olarak, organın yeniden şekillenmesi, doku onarımı, yara iyileşmesi ve enfeksiyonlara karşı bağışıklık için inflamasyon gerekmektedir. İnflamasyon, vücuda zararlı durumları kontrol altına almak ve iyileşme sürecini başlatmak için koruyucu bir reaksiyondur. İnflamatuar yanıtın aşırı reaksiyonu genellikle doku zedelenmesi ve organ fonksiyon bozukluğu gibi çoklu yan etkilere neden olur. Obeziteye bağlı inflamasyon, yağ dokusu ve karaciğerde, yüksek makrofaj infiltrasyonu ve pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonu ile başlamaktadır. Proinflamatuar sitokinler, sistemik inflamasyona neden olmak için kan dolaşımına girer. Obezitede, inflamasyonun hem faydalı hem de zararlı etkileri vardır. (Ye, 2012;2013)

Obezite ile inflamasyon ilişkisi anti-inflamatuar ilaç olan aspirinin kan glukozunun düşürdüğü gözlemlendiğinde ortaya çıkmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda obez hasta veya hayvanların plazmasında C-reaktif protein (CRP), interlökin 6 (IL-6), plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ve diğer birçok inflamasyon aracısı bulunmuştur (Kershaw, 2004; Halberg, 2008). Ek olarak, I κ Ba kinaz β (IKK β) ve c-Jun N-terminal kinaz 1 (JNK1) gibi inflamasyon yollarındaki sinyal moleküllerinin aktivitelerinin yağ dokusu ve karaciğerde arttığı bulunmuştur (Yuan,2001; Hirosumi, 2002). Bu hücre içi sinyal yolları, obezite durumunda TNF-a, serbest yağ asitleri, diagliserit (DAG), seramid, ROS ve hipoksi ile aktive edilir (Ye,2009). TNF-a, insülin sinyalizasyon yolunda IRS-1'i inhibe etmek için p55 reseptöründen etki eder (Yuan, 2001). IKK β ve JNK1'in aktivasyonu, TNF-a tarafından IRS-1 inhibisyonunda yer almaktadır (Peraldi, 1996; Yuan, 2001; Gao, 2002). TNF- α ayrıca adipoz dokuda insülin direncinin indüklenmesinde PPAR γ fonksiyonunu da inhibe etmektedir (Ye, 2013) Yağ ve dolaşımdaki pro-inflamatuar sitokinlerin yükselmesi obezite ile korelasyon içerisindedir (Kershaw, 2004; Halberg, 2008). Temsili sitokinler arasında TNF-a, IL-1, IL-6, MCP-1 ve PAI-1 bulunmaktadır.

Arokiyaraj ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada streptozotosinle ile indüklenerek diyabetik hale getirilmiş sıçanlarda *H.perforatum*'un kan şekeri ve kan lipiti parametlerinin üzerindeki etkisine bakılmıştır. Streptozotosin β hücre harabiyeti verip yetersiz insulin salgılanmasına ve dolayısıyla hiperglisemiye sebep olmaktadır. Aşırı glikoz üretimi ve dokularda glikoz kullanımının azalması Diabetes mellitusda hipergliseminin temel dayanağı olduğu bilinmektedir (Arokiyaraj vd.,2011). Bu çalışmada araştırmacılar diyabetik hale getirilmiş ve diyabetik olmayan Wistar fareleri kullanmışlardır. Diyabetik hale getirilmiş farelere *H.perforatum*'un artan dozlarda vermişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında *H.perforatum* ekstraktı uygulanmasının diyabetle yükselen kan glukoz seviyesini yeniden sağlıklı grupta eşit seviyeye düşürdüğünü belirtmişlerdir. Plazma insülin seviyesi streptozotosin ile indüklenmiş sıçanlarda normal sıçanlara göre yaklaşık 2,5 kat azaldığı *H.perforatum* ekstraktının bu durumu normalize ettiğini belirtmişlerdir. Total kolestrol normal kontrole kıyasla streptozotosinle indüklenmiş diyabetik kontrolde yaklaşık 4 kat artırdığı, *H.perforatum* ekstraktı uygulamasının bu seviyeyi anlamlı şekilde aşağı çektiği

bildirilmiştir HDL-kolesterol diyabetik kontrolde normale kıyasla 3 kat daha düşük olduğu ve *H.perforatum*'un 200 mg/kg uygulamasının bunu normalize ettiği belirtilmiştir. Trigliserit seviyesi diyabetik kontrolde 4 kat daha arttığı, *H.perforatum* bu seviyeyi anlamlı şekilde düşürdüğü araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Bu *in vivo* bulgular *Hypericum perforatum*'un antiobezite ve antidiyabetik özelliklerini kanıtlar niteliktedir ve bitkinin obezite ve obeziteyle ilişkili hastalıklara etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması için araştırmacıları moleküler düzeyde çalışmaya teşvik etmektedir. Bizim çalışmamızda *Hypericum perforatum*'un obeziteyle ilişkisini anlamak üzere obezite, insülin direnci ve inflamasyonla ilişkilendirilmiş genler marker olarak kullanılmıştır. Bunlardan Col-V, DGAT, LPL'in adipositeyle artan ekspresyonları bitki ekstraktı uygulamasıyla downregüle olmuştur. Arokiyaraj ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bu açıdan bizim çalışmamızla örtüşmektedir.

Husain ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada *H.perforatum*'un hipolipidemik ve antiobezite aktivitesi kanıtlanmıştır. Bu çalışmada sıçanlara yüksek yağlı ve fruktozlu diyet uygulanmış daha sonra artan dozlarda *H.perforatum* ekstraktının verilmesi sağlanmıştır. *H.perforatum* ekstraktı uygulaması 30 gün sonunda günlük gıda alımını anlamlı şekilde azaltmıştır. *H.perforatum* ekstraktı uygulaması yağ doku birikimini de inhibe etmiştir. *H.perforatum* antiobezite etkisini gösteren bu çalışma bizim hücresel anlamda obeziteyi mimik ettiğimiz ve *H.perforatum*'un etkisini araştırdığımız çalışmamızla paralel seyretmektedir. Bizim çalışmamızda da adiposite markerları olan DGAT ve LPL'in ekspresyonlarının *H.perforatum* uygulamasıyla downregüle edildiği gözlenmiştir.

Tian ve arkadaşları (2015) *H.perforatum*'un lipid metabolik yollar üzerindeki etkisini belirlemek üzere çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada farelerin yüksek yağlı diyetle 14 gün boyunca beslenmeleri sağlanmıştır. Daha sonra farelere yüksek dozda ve düşük dozda *H.perforatum* uygulanması sağlanmıştır. Yüksek yağlı diyetle indüklenmiş farelerde hiperkolesterolemi gelişimi gözlenmiştir. Farelerdeki seviyeler karşılaştırıldığında düşük doz ve yüksek doz *H.perforatum* uygulanan gruplarda, total kolesterol %16.2 ve %22.2 oranında anlamlı şekilde azaldığı ve serum trigliserit düzeyleri doza bağımlı şekilde %13.1 ve %22.6 düştüğü belirtilmiştir. İskelet kasında intromyosellüler lipid birikimi, insülin direnci ve dislipidemi ile ilişkilendirilmiştir.

Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde iskelet kaslarındaki trigliserit içeriğinin belirgin olarak arttığını ve değişimin *H.perforatum* ekstrakt (100 mg/kg- 200 mg/kg) uygulaması ile tersine döndüğünü rapor etmişlerdir. Araştırmacılar *H.perforatum*'un dislipidemi üzerindeki mekanizmalarını anlamak için, lipit metabolizmasına katılan genlerin gen ifadesini incelemişlerdir. Yağ asidi ana taşıyıcısı olan FATP1, yüksek yağlı diyetle beslenen obez farelerinin iskelet kasında önemli derecede arttığını, *H.perforatum* uygulamasının FATP1'in gen ekspresyonunu azalttığını rapor etmişlerdir. Yağ asidi oksidasyonunun önemli bir düzenleyicisi olan CPT-1, yüksek yağlı diyetle beslenen obez farelerinin iskelet kasında hafif derecede artarken *H.perforatum*'un yüksek dozda CPT-1 ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir. LPL trigliseritlerin yağ asidi ve gliserole dönüşmesinde rol alan enzimdir, bizim çalışmamızda da *Hypericum perforatum*'un adipositeyle artan LPL seviyesini inhibe ettiği ve preadiposit hücrelerinin seviyesine kadar düşürdüğü gözlemlenmiştir. Adipositeyle ilgili elde ettiğimiz veriler Tian ve arkadaşlarının çalışmasıyla paralel seyretmektedir.

Amini ve arkadaşlarının (2009) yaptığı çalışmada *H.perforatum*'un adipositeyle ilişkisini anlamak üzere 3T3-L1 hücre hattı kullanılmıştır. Obezite yağ dokusunun hacimce ya da boyut olarak büyümesiyle pozitif korelasyon içindedir. Büyük adipositler TNF- α , IL-6, MCP-1 gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılar ve glikoz ve lipid metabolizma bozukluklarını tetiklemektedir. Normal adipositler glikoz ve lipit metabolizmasını düzenleyen adiponektin gibi anti-inflamatuvar proteinleri salgılamaktadırlar. Adiponektin ifadesi PPAR- γ tarafından düzenlenmektedir. PPAR- γ adiponektinin promotorundaki PPAR- γ duyarlı elemana bağlanıp adiponektin gen transkripsiyonunu arttırmaktadır. PPAR- γ 'ın aktivasyonu küçük adipositlerden adiponektin salgısını arttırmaktadır. Birlikte ele alındığında metabolik sendromun önlenmesi için büyük adiposit sayısında azalma ve normal küçük adiposit sayısında artış önem taşımaktadır. Obezite, metabolik sendroma neden olan kronik düşük dereceli bir inflamasyon hali olduğundan, *H.perforatum*'un anti-inflamatuvar etkileri olup olmadığını araştırmak önemlidir. Bulgular, *H.perforatum* ekstraktlarının inflamatuvar maddeyi inhibe ederek metabolik sendromun önlenmesinde faydalı

olabileceğini düşündürmektedir. Çalışma *H.perforatum* ekstraktlarının PPAR- γ yolu ile adiponektin ekspresyonunu artırdığını göstermiştir.

Karaboğa ve ark. (2017) yaptığı çalışmada *Hypericum perforatum*'un mide mukoza hasarında iyileştirici etkiye sahip olup olmadığını gözlemek amacıyla ülserle sahip olan sıçanlar kullanılmıştır. Ülserle sahip olan sıçanlara *Hypericum perforatum*'un etanolde çözülmüş ekstraktı uygulanmıştır ve bu uygulama sonrasında bitki ekstraktının sıçanlardaki ülser skorunu düşürücü etkisi olduğu rapor edilmiştir. Ülserin bir inflamasyon durumu ve *Hypericum perforatum*'un da antiinflamatuvar özelliğe sahip bir bitki olduğu bilindiğinden çalışmada ELISA metoduyla inflamasyon belirteci olan IL-6 kullanılmıştır. Araştırmacıların yaptığı çalışmada ülser durumuyla artmış olan IL-6 seviyesinin *Hypericum perforatum*'un etanolde çözülmüş ekstraktının verildiği örnek grubunda azaldığı görülmüştür. Her ne kadar istatistiki olarak anlamlı bulunmasa da bizim çalışmamızda da *H.perforatum* ekstraktlarının 50 $\mu\text{g/ml}$ -48 saat ve 100 $\mu\text{g/ml}$ -24 saat uygulamalarının adipositeyle artmış olan IL-6 ekspresyonunu düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu açıdan çalışmalar birbiriyle paralel seyretmektedir ve *Hypericum perforatum*'un antiinflamatuvar etkisini kanıtlar niteliktedir.

Menopoz sonrası kadınlarda gıda alımının ve karın içi yağlanmanın arttığı bilinmektedir. You ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada postmenapozal dönemi hayvanlar üzerinde göstermek ve *Hypericum perforatum*'un hiperlipidemiye etkisini gözlemek amacıyla farelere overektomi yapılmıştır. Overektomi sonrası farelerde adipositenin ve kilo alımının arttığı gözlemlenmiştir. *Hypericum perforatum* ekstraktının farelere verilmesi farelerde kilo alımını ve yeme isteğini azaltmıştır. Çalışma sonucunda menopoz sonrası kadınlarda metabolik sendrom gibi sorunlarla karşılaşıldığında *Hypericum perforatum*'un kullanılabilir nitelikte olduğu ancak bunun için ileri çalışmalar gerektiği ortaya konulmuştur. Daha önceki çalışmalarla obeziteyle ilişkilendirilen *Hypericum perforatum* bitkisinin menopoz sonrası metabolik sendrom gibi rahatsızlıkların iyileştirilmesinde de kullanılabileceği bu çalışma sonucunda elde edilen verilerle ortaya konulmuştur.

Perez-Ramirez ve ark. (2019) yaptığı çalışmada *Hypericum perforatum*'un hepatoprotektif özelliğini gözlemek amacıyla obez ve sağlıklı fare grupları

oluşturulmuş daha sonra obez gruptaki farelere *Hypericum perforatum* ekstraktı verilmiştir. Obez grupta sağlıklı grupta kıyasla vücut ağırlığı artışı, karaciğerde lipit akümüasyonu artışı, serum trigliserit seviyesinde ve serum yağ asidi seviyesinde artış gözlemlenmiştir. *Hypericum perforatum* ekstraktı verilen grupta farelerin vücut ağırlığının anlamlı bir şekilde düştüğü gözlemlenmiştir. Serum yağ asidi ve serum trigliserit seviyesini *Hypericum perforatum* ekstraktı uygulamasının düşürdüğü rapor edilmiştir. Obezitenin inflamasyona etkisini gözlemlemek amacıyla inflamatuvar ajanlar TNF- α ve IL-6 genlerinin ekspresyonu incelenmiştir, obeziteyle artan TNF- α ve IL-6 ekspresyonlarının *Hypericum perforatum* uygulamasıyla düştüğü gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da adipositlerde *H.perforatum* uygulamasının, IL-6'nın ekspresyon seviyesini istatistiki olarak anlamlı olmasa da düşürdüğü belirlenmiştir bu açıdan kıyaslanınca çalışmalar birbirine paralel seyretmektedir. Ayrıca araştırmacılar, lipit metabolizmasıyla ilişkili FAS, FABP (fatty acid binding protein), Asetil CoA karboksilaz ve Asetil CoA dehidrogenaz gibi genlerin ekspresyon seviyesindeki değişim incelenmiştir. Çalışma, *Hypericum perforatum*'un lipit metabolizması genlerini iyileştirici etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda da istatistiki olarak anlamlı bulunmasa da FAS'in adipositeyle artan mRNA ekspresyonunun *Hypericum perforatum* ekstraktı uygulamasıyla düştüğü belirlenmiştir.

Tüm bu çalışmalar ve bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada obeziteyle, insülin direnciyle ve inflamasyonla ilişkili bulunan 8 markerın 3T3-L1 adipositlerinde taranması sağlanmıştır. Tarama yapılması için pre-adiposit kontrol, adiposit kontrol ve farklı dozlarda bitki ekstraktı uygulanmış adiposit grupları oluşturulmuştur. Daha sonra bu gruplardan elde edilen örneklerle qPCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 3.4.1.'de qPCR ile tarama sonrası elde edilen tüm veriler verilmiştir. Veriler doğrultusunda trigliseritlerin biyosentezinde rol oynayan DGAT geninin adipositeyle yükseldiği ve *Hypericum perforatum*'un farklı dozlarda ekstaktlarının bunu istatistiki olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü görülmüştür.

Bu çalışmada trigliseritleri yağ asitleri ve gliserole çeviren enzim olarak bilinen LPL'in adipositeyle arttığı ve bu artışın *H.perforatum* ekstraktı uygulamasıyla preadiposit kontrol seviyesine kadar düştüğü görülmüştür.

Yağ dokunun elastikiyetini azaltıcı etkiye sahip olduğu bilinen kolojen V'in adipositeyle arttığı bu artışın bitki uygulamasıyla inhibe edildiği yapılan çalışmada gözlemlenmiştir.

Elde edilen veriler *Hypericum perforatum* ile daha önceden yapılan çalışmaları destekleyici niteliktedir.



SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar doğrultusunda *Hypericum perforatum*'un anti-inflamatuar, anti obezite ve insülin duyarlılığını arttırıcı etkisi olduğu bilinmektedir. Bu iyileştirici özellikleri hangi moleküler yolları etkileyerek sağladığı halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan bu çalışmada obezite ve obeziteyle korelasyon içinde olan insülin direnci ve inflamasyon ile ilgili gen bölgelerinin taranması ve *Hypericum perforatum*'un bu gen bölgelerinin ekspresyonunda etkili olup olmadığının gözlemlenmesi sağlanmıştır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda DGAT, LPL ve Col-V için obeziteyi hücrel anlamda mimik eden adipositeyle artan ekspresyonun, *Hypericum perforatum* uygulaması (50-100-150 µg/ml) ile düştüğü gözlemlenmiştir.

Hücrel düzeyde *in vitro* çalışmalarla elde edilen bu veriler *in vivo* çalışmalarla desteklenerek bitkinin obezite ve buna bağlı ortaya çıkan rahatsızlıkları etkileme mekanizması anlaşılabilceği düşünölmektedir. Ayrıca başka genlerle yapılan *in vitro* çalışmalarla ya da transkripsiyon düzeyinde *in vitro* çalışmalarla elde edilen veriler desteklenerek moleküler mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sağlanabilir.

KAYNAKÇA

- Altınova, A., Aktürk, M., Törüner, F. B., & Arslan, M. (2007). Tip 1 Diabetes Mellitus ve İnsülin Direnci. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27(2), 220-223.
- Amini, Z., Boyd, B., Doucet, J., Ribnicky, D. M., & Stephens, J. M. (2009). St. John's Wort inhibits adipocyte differentiation and induces insulin resistance in adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 388(1), 146-149.
- Arner, P. (2003). The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14(3), 137-145.
- Arokiyaraj, S., Balamurugan, R., Augustian, P. (2011). Antihyperglycemic effect of *Hypericum perforatum* ethyl acetate extract on streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pac. J. Trop. Biomed.* 1 (5), 386–390.
- Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res.* 9–20, 523–524.
- Aslan, D. (2005). Klinik Kimyada Temel İlkeler. *Tietz, Burtis CA, Ashwood ER, editörler. Palme yayıncılık, Beşinci Baskıdan Çeviri, Ankara, 961-1027.*
- Barnes, J., Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (2001). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(5), 583-600.
- Bastard, J. P., Jardel, C., Bruckert, E., Blondy, P., Capeau, J., Laville, M., ... & Hainque, B. (2000). Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(9), 3338-3342.

- Baytop, T. (1999). Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present). *Publication of the Istanbul University*, 312.
- Belwal, T., Devkota, H. P., Singh, M. K., Sharma, R., Upadhyay, S., Joshi, C., Bisht K., KumarGour J., Bhatt I., Rawal R.S. & Pande, V. (2019). St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). In *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements* (pp. 415-432). Academic Press.
- Boik, J. (2001). Natural compounds in cancer therapy.
- Boizard, M., Le Liepvre, X., Lemarchand, P., Foufelle, F., Ferré, P., & Dugail, I. (1998). Obesity-related overexpression of fatty-acid synthase gene in adipose tissue involves sterol regulatory element-binding protein transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 29164-29171.
- Bombardelli, E., Morazzoni, P. (1995). *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia* 66, 43–68.
- Bukahri, I.A., Dar, A., Khan, A.R. (2004). Antinociceptive activity of methanolic extracts of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) preparation. *Pak. J. Pharm. Sci.* 17, 13–19.
- Butterweck, V., Wall, A., Liefländer-Wulf, U., Winterhoff, H., & Nahrstedt, A. (1997). Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*, 30(S 2), 117-124.
- Cayci, M.K., Dayioglu, H. (2009). *Hypericum perforatum* extracts healed gastric lesions induced by hypothermic restraint stress in Wistar rats. *Saudi Med. J.* 30, 750–754.
- Chatterjee, S. S., Bhattacharya, S. K., Wonnemann, M., Singer, A., & Müller, W. E. (1998). Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life sciences*, 63(6), 499-510.
- Curtis, J.D. ve Levsten N.R. (1990). Internal secretory structure in *Hypericum*, *Hypericum perforatum* L. and *H. balearicum* L. *New Phytol.* 114:571-580.
- Cornelius, P., Enerback, S., Bjursell, G., Olivecrona, T., & Pekala, P. H. (1988). Regulation of lipoprotein lipase mRNA content in 3T3-L1 cells by tumour necrosis factor. *Biochemical Journal*, 249(3), 765-769.

- Davis, G. E., Bayless, K. J., & Mavila, A. (2002). Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 268(3), 252-275.
- DerMarderosian, A., & Beutler, J. A. (2002). *The review of natural products: the most complete source of natural product information* (No. Ed. 3). Facts and Comparisons.
- Dost, T., Ozkayran, H., Gokalp, F., Yenisey, C., Birincioglu, M. (2009). The effect of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) on experimental colitis in rat. *Dig. Dis. Sci.* 54, 1214–1221.
- Dugoua, J. J., Mills, E. M., Perri, D., & Koren, G. (2006). Safety and efficacy of St. John's wort (*Hypericum*) during pregnancy and lactation. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 13(3).
- Duke, J. A. (2002). *Handbook of medicinal herbs*. CRC press.
- Eckel RH. (1989) Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 320: 1060 –1068.
- Ekren, S. (2012). *Hypericum perforatum* L. Klonlarının Bazı Tarımsal ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *Journal of Agricultural Sciences*, 16(4).
- El-Sherbiny, D.A., Khalifa, A.E., Attia, A.S., Eldenshary, E.-D. (2003). *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 76, 525–533.
- Erdelmeier, C. A. J. (1998). Hyperforin, possibly the major non-nitrogenous secondary metabolite of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*, 31(S 1), 2-6.
- Fried, S. K., & Zechner, R. (1989). Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis, and activity. *Journal of Lipid Research*, 30(12), 1917-1923.

- Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J. (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem*; 277(50): 48115– 48121.
- Gleason, H. A., & Cronquist, A. (1991). *Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada* (Vol. 834). Bronx, NY: New York Botanical Garden.
- Goldberg, I. J., & Merkel, M. (2001). Lipoprotein lipase: physiology, biochemistry, and molecular biology. *Front Biosci*, 6(6), D388-D405.
- Grainger Bisset, N., & Wichtl, M. (2001). Herbal drugs and phytopharmaceuticals. *Medpharm GmbH scientific Publishers, stuttgart, Germany*.
- Greeson, J. M., Sanford, B., & Monti, D. A. (2001). St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*, 153(4), 402-414.
- Greenberg, A. S., Nordan, R. P., McIntosh, J., Calvo, J. C., Scow, R. O., & Jablons, D. (1992). Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer research*, 52(15), 4113-4116.
- Halberg N, Wernstedt-Asterholm I, Scherer PE. (2008). The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37(3): 753–768, x–xi.
- Hammer, K.D., Hillwig, M.L., Solco, A.K., Dixon, P.M., Delate, K., Murphy, P.A., Wurtele, E.S., Birt, D.F. (2007). Inhibition of prostaglandin E(2) production by antiinflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 mouse macrophage cells. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7323–7331.
- Harris, C. A., Haas, J. T., Streeper, R. S., Stone, S. J., Kumari, M., Yang, K., Han, X., Brownell, N., Gross R., Zechner R., & Farese, R. V. (2011). DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *Journal of lipid research*, 52(4), 657-667.
- Hartman, A. D. (1981). Lipoprotein lipase activities in adipose tissues and muscle in the obese Zucker rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 241(2), E108-E115.

- Hatano, T., Sameshima, Y., Kawabata, M., Yamada, S., Shinozuka, K., Nakabayashi, T., & Mizuno, H. (2014). St. John's wort promotes adipocyte differentiation and modulates NF- κ B activation in 3T3-L1 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(7), 1132-1138.
- He, Q., Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Yun, Z., & Ye, J. (2011). Regulation of HIF-1 α activity in adipose tissue by obesity-associated factors: adipogenesis, insulin, and hypoxia. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(5), E877-E885.
- Hemati, A., Azarnia, M., Angaji, A.H. (2010). Medicinal effects of *Heracleum persicum* (Golpar). *Middle-East J. Sci. Res.* 5, 174–176.
- Hışıl, Y., Şahin, F., & Omay, S. B. (2005). Kantaronun (*Hypericum perforatum* L.) bileşimi ve tıbbi önemi. *International Journal of Hematology and Oncology*, 15, 212-8.
- Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*; 420(6913): 333–336.
- Hostanska, K., Reichling, J., Bommer, S., Weber, M., Saller, R. (2003). Hyperforin a constituent of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. *Eur. J. Pharm.* 56, 121–132.
- Hostettmann, K., Wolfender, J.L. (2005). Phytochemistry. In: Muller, W.E. (Ed.), *St. John's Wort and Its Active Principles in Depression and Anxiety*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 5–20.
- Hotamisligil, G. S. (1999). The role of TNF α and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *Journal of internal medicine*, 245(6), 621-625.
- Hotamisligil, G. S. (2000). Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *International Journal of Obesity*, 24(S4), S23.
- Hotamisligil, G. S. (2003). Inflammatory pathways and insulin action. *International Journal of Obesity*, 27(S3), S53.

- Husain, G. M., Chatterjee, S. S., Singh, P. N., & Kumar, V. (2011). Hypolipidemic and antiobesity-like activity of standardised extract of *Hypericum perforatum* L. in rats. *ISRN pharmacology*, 2011.
- Huysal, K. (1999). Tip II Diabetlilerde Eritrosit Glutasyon Redüktaz, Glutasyon Peroksidaz, Süperoksit Dismutaz, Katalaz Aktiviteleri, Hemoglobin Glikozilasyonu ve Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi. *Biyokimya Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi*.
- Hyun, T.K., Kim, J.S. (2009). The pharmacology and clinical properties of *Kalopanax pictus*. *J. Med. Plant Res.* 3, 613–620.
- Kanemaki, T., Kitade, H., Kaibori, M., Sakitani, K., Hiramatsu, Y., Kamiyama, Y., Ito S., & Okumura, T. (1998). Interleukin 1 β and interleukin 6, but not tumor necrosis factor α , inhibit insulin-stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes. *Hepatology*, 27(5), 1296-1303.
- Karaboğa, İ., Dökmeci, A. H., Ovalı, M. A., & Yılmaz, A. (2017). Etanol Uyarımlı Sıçan Akut Mide Mukoza Hasar Modelinde *Hypericum perforatum*'un Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi.
- Kern, P. A., Ranganathan, S., Li, C., Wood, L., & Ranganathan, G. (2001). Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 280(5), E745-E751.
- Kershaw EE, Flier JS. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*; 89(6): 2548–2556 7.
- Kim, S. J., Bang, C. Y., Guo, Y. R., & Choung, S. Y. (2016). Anti-obesity effects of aster *spathulifolius* extract in high-fat diet-induced obese rats. *Journal of medicinal food*, 19(4), 353-364.
- Klemow, K. M., & Raynal, D. J. (1983). Population biology of an annual plant in a temporally variable habitat. *The Journal of Ecology*, 691-703.

- Klemow, K. M., Bartlow, A., Crawford, J., Kocher, N., Shah, J., & Ritsick, M. (2011). 11 Medical Attributes of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Lester Packer, Ph. D.*, 211.
- Kliwer, S. A., & Willson, T. M. (1998). The nuclear receptor PPAR γ -bigger than fat. *Current opinion in genetics & development*, 8(5), 576-581.
- Koren, D., & Taveras, E. M. (2018). Association of sleep disturbances with obesity, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Metabolism*, 84, 67-75.
- Linde, K., Ramirez, G., Mulrow, C. D., Pauls, A., Weidenhammer, W., & Melchart, D. (1996). St John's wort for depression—an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *Bmj*, 313(7052), 253-258.
- Milis-Torres Sr., V., Tenovis, B., Jasevis, V., Dragojevis Simis, V., Dordjevic, A., Simplicio, A.L. (2010). Fullerenol C60 (OH) 24 prevents doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats. *Pharmacol. Rep.* 62, 707–718.
- Müller, W. E., Singer, A., Wonnemann, M., Hafner, U., Rolli, M., & Schäfer, C. (1998). Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of hypericum extract. *Pharmacopsychiatry*, 31(S 1), 16-21.
- Nahrstedt, A., Butterweck, V. (1997). Biologically active and other chemical constituents of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* 30, 129–134.
- Nathan, P.J. (1999). The experimental and clinical pharmacology of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *Mol. Psychiatry* 4, 333–338.
- Newall, C.A., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (1996). *Herbal Medicines. A Guide for Health-Care Professionals*, first ed. Pharmaceutical Press, London
- Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., & Abraham, J. P. (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The lancet*, 384(9945), 766-781.
- Nicolaou, K. C., Carenzi, G. E., & Jeso, V. (2005). Construction of highly functionalized medium-sized rings: synthesis of hyperforin and perforatumone model systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(25), 3895-3899.

- Nieto-Vazquez, I., Fernández-Veledo, S., de Alvaro, C., & Lorenzo, M. (2008). Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes*, 57(12), 3211-3221.
- Mitrakou, A., Kelley, D., Mokan, M., Veneman, T., Pangburn, T., Reilly, J., & Gerich, J. (1992). Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. *New England Journal of Medicine*, 326(1), 22-29.
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D. R., Miles, J. M., Yudkin, J. S., Klein S., & Coppack, S. W. (1997). Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(12), 4196-4200.
- Møller, H., Mellemegaard, A., Lindvig, K., & Olsen, J. H. (1994). Obesity and cancer risk: a Danish record-linkage study. *European journal of cancer*, 30(3), 344-350.
- Olefsky, J. M. (1990). The insulin receptor: a multifunctional protein. *Diabetes*, 39(9), 1009-1016.
- Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. (1996). Tumor necrosis factor (TNF)- α inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem*; 271(22): 13018–13022.
- Pérez-Ramírez, I. F., Gallegos-Corona, M. A., González-Dávalos, M. L., Mora, O., Rocha-Guzmán, N. E., & Reynoso-Camacho, R. (2019). Mechanisms Associated with the Effect of *Hypericum perforatum* and *Smilax cordifolia* Aqueous Extracts on Hepatic Steatosis in Obese Rats: A Lipidomic Approach. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(2), 1800403.
- Reuter, H. D. (1998). Chemistry and biology of *Hypericum perforatum* (St. John's wort). In *ACS Symposium Series* (Vol. 691, pp. 287-298). American Chemical Society.
- Robbers, J. E., & Tyler, V. E. (1999). *Tyler's herbs of choice. The therapeutic use of phytomedicinals*. Haworth Press Inc.
- Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2000). Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & development*, 14(11), 1293-1307.

- Sadur, U. N., Yost, T. J., & Eckel, R. H. (1984). Insulin responsiveness of adipose tissue lipoprotein lipase is delayed but preserved in obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 59(6), 1176-1182.
- Sanchez-Muniz, F.J., Olivero-David, R., Triki, M., Salcedo, L., Gonzalez-Munoz, M.J., Cofrades, S., Ruiz-Capillas, C., Jimenez-Colmenero, F., Benedi, J. (2012). Antioxidant activity of *Hypericum perforatum* L. extract in enriched n-3 PUFA pork meat systems during chilled storage. *Food Res. Int.* 48, 909–915.
- Schmitt, L.A., Liu, Y., Murphy, P.A., Birt, D.F. (2006). Evaluation of the light-sensitive cytotoxicity of *Hypericum perforatum* extracts, fractions, and pure compounds. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2881–2890.
- Schoonjans, K., Staels, B., & Auwerx, J. (1996). The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1302(2), 93-109.
- Shokrzadeh, M., Saeedi Sarvari, S.S. (2009). Chemistry, pharmacology and clinical properties of *Sambucus ebulus*: a review. *J. Med. Plant Res.* 4, 95–103.
- Shuman, C. R. (1988). Diabetes mellitus: definition, classification, and diagnosis. *Diabetes Mellitus. Galloway, Potvin, Shuman (eds). Lilly Research laboratories. Indianapolis, Indiana.*
- Singh, J. (2017). St. John's Wort (*Hypericum perforatum*)—Benefits, Uses, Dosage, Interactions, Side Effects and Contraindications. Available from: <https://www.ayurtimes.com/medicinal-plants/>
- Spencer, M., Yao-Borengasser, A., Unal, R., Rasouli, N., Gurley, C. M., Zhu, B., Peterson C.A., & Kern, P. A. (2010). Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299(6), E1016-E1027.
- Staffeldt, B., Kerb, R., Brockmöller, J., Ploch, M., & Roots, I. (1994). Pharmacokinetics of hypericin and pseudohypericin after oral intake of the *Hypericum perforatum* extract LI 160 in healthy volunteers. *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 7(1_suppl), 47-53.

- Stouthard, J. M., Romijn, J. A., Van der Poll, T., Endert, E. R. I. K., Klein, S. A. M. U. E. L., Bakker, P. J., ... & Sauerwein, H. P. (1995). Endocrinologic and metabolic effects of interleukin-6 in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 268(5), E813-E819.
- Tedeschi, E., Menegazzi, M., Margotto, D., Suzuki, H., Förstermann, U., Kleinert, H. (2003). Anti-inflammatory actions of St. John's wort: inhibition of human inducible nitric oxide synthase expression by downregulating signal transducer and activator of transcription1alpha (STAT1alpha) activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307, 254–261.
- Terrettaz, J., Cusin, I., Etienne, J., & Jeanrenaud, B. (1994). In vivo regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically-obese (fa/fa) rats. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 18(1), 9-15.
- Tian, J. Y., Tao, R. Y., Zhang, X. L., Liu, Q., He, Y. B., Su, Y. L., Ji, T. F. & Ye, F. (2015). Effect of Hypericum perforatum L. Extract on Insulin Resistance and Lipid Metabolic Disorder in High-Fat-Diet Induced Obese Mice. *Phytotherapy research*, 29(1), 86-92.
- Türkiye Obezite (Şişmanlık) ile Mücadele ve Kontrol Programı (2010-2014), (2010)
- Vehapoglu, A., Ustabas, F., Ozgen, T. I., Terzioglu, S., Cermik, B. B., & Ozen, O. F. (2015). Role of circulating adipocytokines vaspin, apelin, and visfatin in the loss of appetite in underweight children: a pilot trial. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 28(9-10), 1065-1071.
- Ye, J. (2007). Role of insulin in the pathogenesis of free fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 7(1), 65-74.
- Ye J. (2009). Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*; 33(1): 54–66
- Ye, J., & McGuinness, O. P. (2012). Inflammation during obesity is not all bad: evidence from animal and human studies. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 304(5), E466-E477.

- Ye, J. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of medicine*, 7(1), 14-24.
- Yen, C. L. E., Stone, S. J., Koliwad, S., Harris, C., & Farese, R. V. (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of lipid research*, 49(11), 2283-2301.
- Yıldırım, B., Terzioğlu, Ö., Okut, N., Ekici, K., & Özgökçe, F. (2009) Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) Bitkisinin Farklı Gelişme Dönemlerinde Uçucu Yağ İçeriğinin Belirlenmesi. Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, Hatay, 326-329.
- You, M. K., Rhuy, J., Jeong, K. S., Bang, M., Kim, M. S., & Kim, H. A. (2014). Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on obesity, lipid metabolism and uterine epithelial proliferation in ovariectomized rats. *Nutrition research and practice*, 8(3), 292-296.
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*; 293(5535): 1673–1677
- Yudkin, J. S., Yajnik, C. S., Mohamed-Ali, V., & Bulmer, K. (1999). High levels of circulating proinflammatory cytokines and leptin in urban, but not rural, Indians: a potential explanation for increased risk of diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care*, 22(2), 363.
- Zechner, R. U. D. O. L. F., Newman, T. C., Sherry, B. A. R. B. A. R. A., Cerami, A. N. T. H. O. N. Y., & Breslow, J. L. (1988). Recombinant human cachectin/tumor necrosis factor but not interleukin-1 alpha downregulates lipoprotein lipase gene expression at the transcriptional level in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and cellular biology*, 8(6), 2394-2401.
- Zou, Y., Lu, Y., Wei, D. (2004). Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5032–5039.
- Wang, H., & Eckel, R. H. (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(2), E271-E288.

Web-1: <https://www.premierseedsdirect.com/product/st-johns-wort-hypericum-perforatum/>
Erişim: 18.04.2019

Web-2: <https://www.atcc.org/~media/6124AF1E4C2A47CF904435117909AC25.ashx>
Erişim: 18.04.2019

Web-3: <http://bohemiagenetics.cz/wp-content/uploads/2015/01/RiboEx-Protocol.pdf>
Erişim: 18.04.2019

Web-4: <https://www.abmgood.com/PCR/pdfs/EasyScriptPlusReverseTranscriptaseSL1213-G237.pdf> Erişim: 18.04.2019

Web-5: <https://www.abmgood.com/Taq-DNA-Polymerase-PCR-G009.html> Erişim:
18.04.2019

Web-6: <https://www.biovision.com/documentation/datasheets/K580.pdf> Erişim 18.04.2019

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad :Hilal BüşraTokgöz
Uyruk :T.C.
Doğum Tarihi :28/02/1994
Doğum Yeri :İstanbul/Avcılar
Medeni Hali :Bekar
Telefon :0 505 838 29 76
E-posta :hilalbusratokgoz@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Yatağan Anadolu Lisesi	2012
Lisans	Kilis 7 Aralık Üniversitesi	2016

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/Görev
2018-Halen	TÜBİTAK	Bursiyer
2017-2018	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü	Kısmi Zamanlı Öğrenci

Yabancı Dil

Dil (İngilizce)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Anlama		X	
Okuma		X	

Katıldığı Eğitimler ve Bilimsel Faaliyetler

- GLP Eğitimi Kasım 2012, Kilis 7 Aralık Üniversitesi
- 21. Biyoloji Öğrenci Kongresi, Poster Sunumu Temmuz 2014, Karadeniz Teknik Üniversitesi
- Erasmus Sertifikası, University of Lodz (2014-2015)
- Genetik Kış Okulu Mart 2016, İstanbul Üniversitesi
- 7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Posterli Katılım Sertifikası, 25-27 Mayıs, Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi
- 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2019), Sözlü Sunumla Katılım, 28-29 Haziran, Ankara