



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

**HEPATOSİTLERDE GLİKOLİPİT
METABOLİZMASININ SİRKADİYEN
RİTİM İLE İLİŞKİLİ MEKANİZMALAR
ARACILIĞIYLA İNCELENMESİ**

ECENUR ÖZKUL ERDOĞAN

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ BANU BAYRAM**

**BESLENME VE DİYETETİK ANA BİLİM DALI
BESLENME VE DİYETETİK DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
NİSAN/2025**

İTHAF

“Tezimi en az benim kadar emeđi olan eşim ve anneme ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve doktora süresince bana yol gösteren sayın danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Banu BAYRAM hocama tüm emekleri ve yardımları için teşekkür ederim. Okula başladığım günden beri okumam için beni teşvik eden, her koşulda bana inancı hiç bitmeyen anneme minnettarım. Tüm eğitimimde ve hayatım boyunca beni destekleyen babam ve abime teşekkür ederim. Daha doktora başlamamışken başlayan doktora dertlerimde beni hep dinleyen sevgili arkadaşlarıma teşekkürü borç biliyorum.

Yeri geldiğinde beni zorla ders çalışmam için masaya oturtan, bana benden daha fazla güvenen, saatlerce laboratuvarı kapıda beni bekleyen, ben tez yazarken defalarca evi temizleyen sevgili eşim olmasa bu süreç olduğundan çok daha zor olurdu.

Doktora sürecimde TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı kapsamında doktora sürecimi desteklediği için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ÖZET.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. GLİKOLİPİTLER.....	3
2.1.1. Glikolipitlerin Yapısı ve Fonksiyonları.....	3
2.1.2. Hepatositlerde Glikolipit Metabolizması.....	4
2.1.3. Glikolipit Metabolizmasında Anahtar Mekanizmalar.....	5
2.1.4. Glikolipit Mekanizması ve Kronik Hastalıkların İlişkisi.....	6
2.1.4.1. Reaktif oksijen türleri ve glikolipit aracılı kronik hastalıklar.....	7
2.1.4.2. Mitokondri disfonksiyonu ve glikolipit aracılı kronik hastalıklar.....	7
2.1.4.3. Glikoz alımı ve glikolipit aracılı kronik hastalıklar.....	8
2.2. POLİFENOLLER.....	9
2.2.1. Polifenollerin Sağlık Üzerine Etkileri.....	9
2.2.2. Polifenollerin Glikolipit Mekanizması Üzerine Etkisi.....	10
2.2.3. Nar Polifenolleri ve Sağlık Üzerine Etkisi.....	11
2.2.4. Elajik Asitin Fizikokimyasal Özellikleri, Biyoyararlanımı ve Glikolipit Mekanizması Üzerine Etkisi.....	12
2.3. SİRKADİYEN RİTİMLER.....	13
2.3.1. Sirkadiyen Ritimlerin Temel Bileşenleri.....	13
2.3.2. Sirkadiyen Ritim Bozukluklarının Metabolik Etkilerinin ve Kronik Hastalıklarla İlişkisinin İncelenmesi.....	14
2.3.3. Sirkadiyen Ritimlerin Glikolipit Metabolizmasına Etkisi.....	15
2.3.4. Fenolik Bileşenlerin Glikolipit Mekanizması Üzerine Etkisinin Sirkadiyen Ritmik Genler Ekseninde İncelenmesi.....	16
2.3.5. Elajik Asitin Glikolipit Metabolizması Üzerine Etkisinin Sirkadiyen Ritmik Genler Ekseninde İncelenmesi.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN SARF, KİMYASAL VE CİHAZLAR.....	19

3.2. HÜCRE BÜYÜME KOŞULLARI.....	19
3.3. HÜCRELERİN PASAJLANMASI.....	20
3.4. HÜCRE SAYIMI.....	20
3.5. HÜCRE CANLILIK TESTİ.....	20
3.6. İNHİBİTÖR KONSANTRASYON 50 (IC ₅₀) DEĞERİNİN BELİRLENMESİ	21
3.7. RNA İZOLASYONU	21
3.8. cDNA SENTEZİ.....	21
3.9. GLİKOZ ALIMI DENEYİ.....	23
3.10. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ TAYİNİ.....	24
3.11. MİTOKONDİRİ MEMBRAN POTANSİYELİ DENEYİ.....	24
3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. HEPG2 HÜCRELERİNİN GÖRÜNTÜSÜ.....	26
4.2. HÜCRELERDE CANLILIK DEĞERLERİ.....	26
4.3. ELAJİK ASİDİN SİRKADİYEN RİTM İLE İLİŞKİLİ GENLERİN ANLATIMLARI ÜZERİNE ETKİSİ.....	27
4.4. ELAJİK ASİDİN MİTOKONDİRİ MEMBRAN POTANSİYELİ ÜZERİNE ETKİSİ	30
4.5. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ DENEYİ.....	32
4.6. GLİKOZ ALIM DENEYİ	32
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR	50

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: İncelenen genlerin primer dizileri	23
--	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1: HepG2 hücrelerinin görüntüsü	26
Şekil 4.2: Farklı konsantrasyonlardaki elajik asit ve glukozamin uygulaması sonucunda elde edilen canlılık değerleri.....	27
Şekil 4.3: CD36, PPAR- γ , HMGCR, APOA1, LDLR, CRY1, CRY2, NR1H3, genlerinin anlatımlarında değişimler.	28
Şekil 4.4: NR1H2, MTNR1A, STAT3, SREBF1, SIRT1, PER1, PER2, CLOCK, BMAL1, PPAR- α , PPARGC1A, GLUT4 genlerinin anlatımlarında değişimler.....	29
Şekil 4.5: Elajik asit ve glukozamin uygulamalarında mitokondri membran potansiyeli değişiklikleri ve istatistiksel değerlendirme	31
Şekil 4.6: Elajik asit ve glukozamin uygulamalarında reaktif oksijen türleri değerleri	32
Şekil 4.7: Elajik asit ve glukozamin uygulamalarında glikoz alım değerleri.....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ACC	: Asetil-CoA Karboksilaz
ADP	: Adenozin Difosfat
AKT/PI3K/mTOR:	Protein Kinaz B/Fosfatidilinositol 3-Kinaz/Memeli Hedef rapamisin
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AMP	: Adenozin Monofosfat
AMPK	: AMP-Aktive Protein Kinaz
AMPKα	: AMP-Aktive Protein Kinaz Alfa
APOA1	: Apolipoprotein A1
ARE	: Antioksidan Yanıt Elementi
ARNT	: Aril Hidrokarbon Reseptör Nükleer Translokator
ARNTL	: Beyin ve Kas ARNT Benzeri 1
AST	: Aspartat Aminotransferaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
BLAST	: Temel Yerel Hizalama Arama Aracı
BMAL1	: Beyin ve Kas ARNT Benzeri 1
BSA	: Bovin Serum Albümini
C/EBPα	: CCAAT/Enhancer Bağlanma Proteini Alfa
CAT	: Katalaz
CCCP	: Karbonil Siyanür m-Klorofenilhidrazon
CD36	: Kümeleşme Farklılaşma Antijeni 36
Cdna	: Komplementer DNA
CLOCK	: Sirkadiyen Lokomotor Çıktı Çevrimleri Kaput

CLOCK	: Sirkadiyen Lokomotor Çıktı Döngüsü Kaputu
COVID-19	: Koronavirüs Hastalığı 2019
CRY1	: Kriptokrom 1
CRY2	: Kriptokrom 2
Cyp7α1	: Kolesterol 7 α -Hidroksilaz
dATP	: Deoksiadenozin Trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin Trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin Trifosfat
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Ortamı
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPPH	: 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
dTTP	: Deoksitimidin Trifosfat
EA	: Elajik Asit
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGCG	: Epigallokateşin Gallat
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERK2	: Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Protein Kinaz 2
FBS	: Fetal Bovin Serum
Fe²⁺	: Demir(II) iyonu
FGF21	: Fibroblast Büyüme Faktörü 21
FXR	: Farnesoid X Reseptörleri
GAPDH	: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz
GLUT	: Glikoz Taşıyıcısı
GLUT-4	: Glikoz Taşıyıcısı Tip 4
GPAT	: Gliserol-3-Fosfat Asiltransferaz

H2O2	: Hidrojen Peroksit
HMGCR	: 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA redüktaz
HNF4A	: Hepatosit Nükleer Faktör 4 Alfa
HSL	: Hormon Duyarlı Lipaz
IC50	: %50 İnhibisyon Konsantrasyonu
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IL-1β	: İnterlökin-1 Beta
IL-6	: İnterlökin-6
IRS-1	: İnsülin Reseptörü Substratı 1
IRS1/2	: İnsülin Reseptörü Substratı 1/2
JC-1	:5,5',6,6'-Tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilkarbosiyanin iyodür
Keap1	: Kelch Benzeri ECH ile İlişkili Protein 1
KRPH	: Krebs-Ringer Fosfat Hapes Tamponu
L-DG	: 2-Deoksi-D-glukoz
LDLR	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü
LPS	: Lipopolisakkarit
LXR	: Karaciğer X Reseptörleri
LXRα	: Karaciğer X Reseptörü Alfa
LXRβ	: Karaciğer X Reseptörü Beta
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinazlar
MTNR1A	: Melatonin Reseptörü 1A
mTOR/PPARγ/RXRα	: Memeli Hedef Rapamisin Reseptörü/Peroksizom Proliferatör-Aktifleştirici Reseptör Gama/Retinoid X Reseptörü Alfa
mTORC1	: Memeli Hedef Rapamisin Kompleksi 1

MTT	:3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NAD(H)	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP(H)	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NAFLD	: Alkolle Bağlantılı Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
NF-Kb	: Nükleer Faktör Kappa B
NLRP3	: Nod-benzeri Reseptör Ailesi, P3
NR	: Nükleer Reseptörler
Nrf2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PER1	: Period Sirkadiyen Düzenleyici 1
PER2	: Period Sirkadiyen Düzenleyici 2
PER3	: Period Sirkadiyen Düzenleyici 3
PGC1α	: Peroksizom Proliferatörü ile Aktive Olan Reseptör Gama Koaktivatörü 1-alfa
PI3K/Akt	: Fosfatidilinositol 3-Kinaz/Akt
PI3K/AKT/GLUT4	:Fosfatidilinositol 3-Kinaz/Protein Kinaz B/Kolaylaştırıcı Glukoz Taşıyıcı 4
PPAR	: Peroksizom Proliferatörle Aktive Olan Reseptörler
PPARGC1A	: Peroksizom Proliferatörle Aktive Olan Reseptör Gama Koaktivatörü 1 Alfa
PPARα	: Peroksizom Proliferatör Aktivatör Reseptörü Alfa
PPARβ/δ	: Peroksizom Proliferatör Aktivatör Reseptörü Beta/Delta
PPARγ	: Peroksizom Proliferatör Aktivatör Reseptörü Gama

PXR	: Pregnan X Reseptörleri
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RoRα	: Retinoik Asit İlişkili Yetim Reseptör Alfa
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PCR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCN	: Suprakiazmatik Nükleus
SGLT	: Sodyum Bağımlı Glikoz Ko-taşıyıcı
SIRT6	: Sirtuin 6
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SRB1	: Süpürücü Reseptör Sınıfı B Üyesi 1
SREBF1	: Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Faktör 1
SREBP1c	: Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein 1c
STAT3	: Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
T2DM	: Tip II Diabetes Mellitus
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
VR-1	: Vanilloid Alt Familyası Üyesi 1
$\mu\text{mol}/\mu\text{l}$	: Mikromol bölü mikrolitre

HEPATOSİTLERDE GLİKOLİPİT METABOLİZMASININ SİRKADİYEN RİTİM İLE İLİŞKİLİ MEKANİZMALAR ARACILIĞIYLA İNCELENMESİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, elajik asidin sirkadiyen ritim gen ekspresyonları üzerindeki düzenleyici etkilerini, karaciğer hastalıklarıyla ilişkili hücresel mekanizmalar çerçevesinde HepG2 hücre kültüründe *in vitro* olarak araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: İnsan hepatokarsinom hücre hattı kullanılarak, elajik asit (0-100 μ M) ve glukozamin (0-50.000 μ M) uygulamaları yapılmıştır. Hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirilmiş, gen ekspresyonları qRT-PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Reaktif oksijen türleri düzeyleri, mitokondriyal membran potansiyeli ve glikoz alımı belirlenmiştir. Veriler tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Elajik asitin IC_{50} değeri 25 μ M olarak belirlenmiştir. Glukozamin uygulaması, BMAL1 ($p<0,0005$), CLOCK ($p<0,0001$) ve GLUT4 ($p<0,05$) gen ekspresyonlarını anlamlı şekilde artırmıştır. Elajik asit, glukozaminin etkilerini tersine çevirerek BMAL1 ($p<0,0005$) ve GLUT4 ($p<0,005$) gen ekspresyonlarını anlamlı şekilde azaltmıştır. CLOCK gen ekspresyonunda ise elajik asit, glukozaminle karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Mitokondriyal membran potansiyelinde, uygulamalar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Glukozamin, reaktif oksijen türleri seviyelerini artırmış ($p<0,0001$), elajik asit bu artışı doza bağlı olarak baskılamıştır ($p<0,0001$). Glikoz alımında doza bağlı olarak artış görülmüştür ($p<0,0001$). Glukozaminle oluşturulan insülin dirençli hücrelerde ise 25 μ M ve 50 μ M elajik asit kombinasyonları glikoz alımını anlamlı şekilde azaltmıştır ($p<0,0001$).

Sonuç: Elajik asit, glukozamin ile oluşturulan metabolik stres koşullarında sirkadiyen ritimle ilişkili gen ekspresyonlarını düzenleyici bir etki göstermiştir. Reaktif oksijen türleri seviyelerindeki düşüş ve mitokondriyal membran potansiyelinde stabilite, elajik asidin hücresel fonksiyonlar üzerindeki koruyucu etkilerini desteklemektedir. Bu bulgular, elajik asidin metabolik bozuklukların tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Elajik Asit, Hepatosit, İnsülin Direnci, Sirkadiyen Ritim

HEPATOCTYTE GLYCOLIPID METABOLISM THROUGH MECHANISMS RELATED TO CIRCADIAN RHYTHM

ABSTRACT

Aim: The objective of this study was to examine the mechanisms linking glycolipid metabolism in hepatocytes with circadian rhythm-related processes, focusing on the cellular mechanisms associated with liver diseases.

Materials and Methods: Human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells were utilized for the study. Various concentrations of ellagic acid (0-100 μ M) and glucosamine (0-50,000 μ M) were applied to the cells. Cell viability was assessed using the MTT assay, and gene expression was analyzed through qRT-PCR. Levels of reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, and glucose uptake were measured. The data were analyzed using one-way ANOVA.

Results: The IC₅₀ value of ellagic acid was determined to be 25 μ M. Glucosamine treatment led to significant increases in the expression of BMAL1 ($p < 0.0005$), CLOCK ($p < 0.0005$), and GLUT4 ($p < 0.05$). Ellagic acid reversed the effects of glucosamine, significantly decreasing the expression of BMAL1 ($p < 0.0005$) and GLUT4 ($p < 0.005$), but no significant change was observed in CLOCK gene expression. There were no significant differences in mitochondrial membrane potential ($p > 0.05$). Glucosamine increased reactive oxygen species levels ($p < 0.0005$), while ellagic acid suppressed this increase in a dose-dependent manner ($p < 0.0005$). A dose-dependent increase in glucose uptake was observed ($p < 0.0005$). In glucosamine-induced insulin-resistant cells, combinations of 25 μ M and 50 μ M ellagic acid significantly reduced glucose uptake ($p < 0.0005$).

Conclusion: Ellagic acid showed a regulatory effect on circadian rhythm-related gene expression in hepatocytes under glucosamine-induced metabolic stress conditions. The reduction in reactive oxygen species levels and the stability of mitochondrial membrane potential suggest protective effects of ellagic acid on cellular functions. These findings highlight the potential of ellagic acid as a therapeutic agent for managing metabolic disorders.

Key Words: Circadian Rhythm, Ellagic Acid, Hepatocytes, Insulin Resistance



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lipitlerin glikosil türevleri olan glikolipitler hücre zarında ve hücre zarının amfifilik bileşenlerinde lokalizedir. Akışkanlık ve lipit salınımı dahil olmak üzere zar özelliklerini etkilerler. Ayrıca, gangliosidlerde hücre tanıma, yapışma, sinyalleme gibi biyolojik rolleri vardır. Glikolipitler birden farklı hücresel mekanizmada rol alır (1). Glikolipit metabolizma bozukluğu, birden fazla metabolik organ düzensizliğinden kaynaklanan karmaşık ve sistemik hastalıklar bütünüdür. Patogenezinde, nöroendokrin eksen disfonksiyonu, insülin direnci, oksidatif stres, kronik inflamatuvar yanıt ve bağırsak mikrobiyota disbiyozu gibi temel mekanizmalar arasındaki etkileşimleri içerir (2).

Metabolik ağın karmaşıklığı nedeniyle farklı metabolik yolların eş zamanlı düzenlenmesi, glikolipit metabolizma bozukluğunun tedavisinde etkili görülmektedir (3). Bu nedenle bitkilerde doğal olarak bulunan fitokimyasallar olan polifenoller birden fazla mekanizmaya müdahale edebildiği için ön plana çıkmıştır. Bitki polifenollerinin insan sağlığı üzerinde çeşitli faydalı etkileri vardır. Antioksidan, antiinflamatuvar etkileri olması gibi yüksek biyolojik aktiviteye sahip olmaları, doğal olarak bulunabilmeleri ve biyoyumlu olmaları önemli avantajlarıdır (4). Polifenoller glikolipit aracılı mekanizmalarda glikoz taşıyıcılar, insülin, hepatik glikoz homeostazı, oksidatif strese ve inflamasyona karşı koruma gibi birden farklı mekanizma ile gösterirler. Lipit metabolizması üzerindeki potansiyel etkileri ise serum kolesterolü, trigliseritlerin ve lipoproteinlerin sentez ve eliminasyon mekanizmalarıyla bağdaştırılır (5).

Glikolipit metabolizma bozukluğu patogenezinin karmaşıklığı nedeniyle, altta yatan moleküler mekanizmaları henüz tamamıyla anlayamamıştır. Yapılan araştırmalar glikolipit mekanizma homeostazının biyolojik saat adı verilen endojen bir sirkadiyen zamanlama sistemiyle koordinasyona dayandığını ileri sürmektedir (6,7). Bu sistem, merkezi sirkadiyen saatten ve çevresel saatlerden oluşur. Beynin hipotalamik suprakiasmatik çekirdeğinde (SCN) bulunan merkezi saat, çeşitli sinyal yolları aracılığıyla, vücut hücrelerinde bulunan tüm çevresel sirkadiyen saatleri senkronize eder. Sirkadiyen ritimlerin bozulması, glikoz ve lipit metabolizmasında bozulmalar olarak ortaya çıkar (8). Gen düzeyinde yapılan araştırmalar sirkadiyen

düzensizliğin metabolizmayı genetik, hücresel ve sistemsel olarak etkilediği, bunun sonucunda bozulmuş glikoz toleransı ve insülin direnci ile metabolik sendrom ve diyabet riskinin arttığını göstermiştir (9,10).

Polifenoller sirkadiyen ritim senkronizasyonunu ve dolayısıyla glikolipit metabolizmasını doğrudan veya metabolizma üzerindeki dolaylı etkileri yoluyla düzenleme potansiyeline sahiptir. Bu etkilerini özellikle hepatik dokularda reaktif oksijen türleri (ROS), mitokondri aracılı mekanizmalar, glikoz homeostazı ve sirkadiyen saat genleri ile gerçekleştirebilirler (5,11). Literatürde etkileri iyi tanımlanmış polifenollerin yanında teropatik etkileri olmasına rağmen etki mekanizmaları tam aydınlatılmamış polifenoller bulunmaktadır. Nar ve üzümü meyvelerde bulunan elajik asit güçlü bir antioksidan olmasına karşın metabolizması açıklığa kavuşmamıştır. Yapılan kısıtlı sayıdaki çalışmalar elajik asiti de içeren polifenol gruplarının uygulamasının sirkadiyen ritimler aracılı glikolipit metabolizmasında etkili olabileceğini bildirmiştir (12,13).

Bu çalışmanın amacı, elajik asitin HepG2 hücre hattında glikolipit mekanizmasına olan etkilerini sirkadiyen ritimle ilişkili genler aracılığıyla *in vitro* olarak belirlemektir. Elajik asidin sirkadiyen ritim-glikolipit aracılı hastalıklarla ilişkisini, insülin direnci ve lipit metabolizması üzerindeki koruyucu etkilerini değerlendirmek amaçlanmaktadır. Elajik asidin bu süreçteki rolünü ve koruyucu etkilerini glikolipit mekanizması bağlamında inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Araştırmanın sonuçlarının, halk sağlığı açısından önemli terapötik yollar açabileceği öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GLİKOLİPİTLER

Glikolipitler, karbonhidrat grubunun glikozidik bağlar aracılığıyla bir lipit grubuna bağlandığı biyomoleküllerdir. Lipitlerin glikosil türevleri olarak sınıflandırılabilirler (14).

2.1.1. Glikolipitlerin Yapısı ve Fonksiyonları

Glikolipitlerin kimyasal yapısı, hidrofobik bir lipit grubu ile hidrofilik bir karbonhidrat grubundan oluşan iki farklı bölümden meydana gelmektedir. Hem hidrofilik hem de hidrofobik özelliklere sahiplerdir. Bu nedenle glikolipitlerin özelliklerini tanımlamak amacıyla "amfifilik" terimi kullanılır. Bu özellik yüzey aktif molekül olarak işlev görmelerini sağlamaktadır (15). Glikolipitler, mikroorganizmaların hücrel metabolizmalarında, agregasyon, disosiyasyon, hücre tanımlama veya hücreler için koruyucu bariyer olma gibi görevlerde kullanılmak üzere doğal olarak biyosentezlenirler (1).

Glikolipitler tüm canlı organizmalarda bulunan hücre zarlarının ve sinyalizasyon moleküllerinin temel bileşenleridir. Hücre-hücre iletişimi, bağışıklık sistemi modülasyonu ve elektron taşınımı gibi birçok biyolojik işlevde rol oynarlar (14). Aynı zamanda hücre zarında belirli alanlarda lokalize olarak biyosentez, hücre içi taşıma ve metabolik yıkım basamaklarında da rol alırlar (16). Gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan lipopolisakkarit (LPS), zarın bütünlüğünü korumaya yardımcı olan ve yabancı moleküllerin girişine karşı bir bariyer işlevi gören bir glikolipite örnektir (17).

Glikolipitler için bağlanma ortakları hem proteinler hem de glikanlar olabilir. Bu bağlanmalar "trans" ve "cis" şeklinde işlev görebilir (17). Hayvan hücre yüzeyinde bulunan ve sinir sistemi, bağışıklık sistemi gibi birçok sistemde önemli rol oynayan glikan bağlayıcı proteinler, sialik asit bağlayıcı immünoglobulin tipi lektinler (siglec) olarak bilinir. Bu proteinler, sialillenmiş glikosfingolipitlerle bağlanarak 'trans'

etkileşimlere örnek oluşturur. "Cis" etkileşimlere ise ganglioizidlerin büyüme faktörü reseptörleri tarafından bağlanması örnek verilebilir. Bu tür etkileşimler, hücrel sinyal sistemlerinin düzenlenmesinde, hücre-matris bağlanmasında ve gelişimde, bağışıklık sisteminde ve diğer birçok süreçte hücreler arası iletişimde önemli roller oynarlar (18).

2.1.2. Hepatositlerde Glikolipit Metabolizması

Karaciğer, glukoz ve lipit homeostazını çeşitli sinyal ve hücrel yollarla kontrol eden merkezi bir organdır. Bu mekanizmalarda görülebilecek dengesizlikler, karaciğer glikolipit metabolizmasında bozulmalara yol açarak metabolik hastalıkların gelişimine katkıda bulunabilir (19). Bu nedenle, karaciğer glikolipit metabolizmasını düzenleyen sinyal yollarının moleküler mekanizmalarını anlamak, metabolik hastalıkların tedavisi için hedeflenmiş terapilerin geliştirilmesinde hayati öneme sahiptir. Hepatik glikolipit metabolizmasını düzenlemede birden fazla faktörün yer aldığı bildirilmiştir (3).

Kronik düşük dereceli inflamasyon, glikolipit metabolizma bozukluğunun belirleyicilerindendir. Kronik metabolik inflamasyon, inflamatuvar ajanlar, karaciğer, yağ, kas, pankreas başta olmak üzere diğer doku ve organlarda glikolipit metabolizmasını geniş bir ağ aracılığıyla düzenler (20). Bu düzenleme insülin direnci (İD) ve glikolipit metabolizma bozukluklarına neden olur. Bu mekanizmaların hepatositlerde hücrel düzeyde gerçekleştiği gösterilmiştir (3).

Hepatositler, glikoliz ve de novo lipogenezin gerçekleştiği hücrelerdir. Karaciğer X reseptörleri (LXR), farnesoid X reseptörleri (FXR) ve peroksizom proliferatörle aktive olan reseptörler (PPAR) gibi nükleer reseptörlerin (NR) alt tipleri, glikolipit metabolizmasının homeostazında rol oynarlar (21). Ayrıca, sirtuin 6 (SIRT6), AMP-aktive protein kinaz alfa (AMPK- α), memeli hedef rapamisin kompleksi 1 (m-TORC1) sinyal yolu, karaciğerde sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1c'yi (SREBP1c) düzenler. Böylelikle hepatik glikolipit metabolizmasının aktif elemanları olarak rol alırlar (22). Ek olarak fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B/kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcı 4 (PI3K/AKT/GLUT4) yolu ve memeli hedef rapamisin reseptörü/peroksizom proliferatör-aktifleştirici reseptör gamma/retinoid X

reseptörü alfa (mTOR/PPAR- γ /RXR- α) yolunun da çevresel kirletici maruziyetinde glikolipit metabolizmasını etkilediği bildirilmiştir (23).

Karaciğerde anormal ATP sentezi de, düzensiz glikolipit homeostazıyla ilişkilendirilmiştir. Karaciğerde ATP azalması oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu değişiklikler obezite, İD, karaciğer lipit birikimi ve metabolik sendromu tetiklemektedir (24). Kronik yüksek yağlı diyetin, ATP üretimini inhibe ederek metabolik bozuklukları şiddetlendirdiğini, ATP sentezindeki azalmanın ATP/ADP oranını düşürdüğünü, mitokondriyal disfonksiyona yol açtığı ve laktat dehidrogenaz seviyelerini artırarak, çoklu metabolik dokularda GLUT'ların değişmiş ekspresyonlarına neden olduğunu gösterilmiştir (25). Gösterilen farklı mekanizmalarla batı tarzı beslenme ve yetersiz fiziksel aktivitenin, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), İD, ve Tip II diabetes mellitus (T2DM) dahil olmak üzere hepatik glikolipit metabolizma bozuklukları ile küresel olarak oldukça yaygın hale geldiği belirtilmiştir (7).

2.1.3. Glikolipit Metabolizmasında Anahtar Mekanizmalar

Glikolipit metabolizmasının düzgün işleyişi, çeşitli doku ve organlar arasında iş birliği gerektirir. Karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusu gibi çeşitli dokuları bağlayan bir metabolik merkez olarak hareket eder ve vücuttaki insülin duyarlılığını ve glukoneogenezi düzenlemede önemli bir rol oynar (26). Glikoz metabolizması bozukluğunda, hepatik İD, insülinin hepatik glukoz çıkışı üzerindeki inhibitör etkisini azaltır. Kan glukozunun artmasına neden olur. Bu nedenle, aşırı hepatik glukoneogenezi inhibe etmek ve endojen glukoz üretimini azaltmak, glukoz metabolizması bozukluklarının tedavisinde kullanılan önemli mekanizmalardan biridir (27). Ayrıca, glukoz metabolizması bozuklukları sırasında İD, karaciğerin yağ asitlerini taşımadaki kapasitesini azaltır, yağ asidi sentez oranını artırır ve kanda yağ asidi seviyelerini yükseltir. Yağ asitlerinin trigliserid formunda hedef doku ve organlarda aşırı birikmesi İD'yi şiddetlendirir. Böylece NAFLD ve karaciğer fibrozisi gibi metabolik hastalıkların oluşmasına ve ilerlemesine neden olur (3).

Karaciğerdeki glukoz ve lipit metabolizması bozukluklarının başlamasını ve şiddetini etkileyen birçok faktör vardır oksidatif stres, AMPK ve NR'ler önemli roller oynar. Hepatositlerde glukotoksisite ve lipotoksisite, karaciğer sinyal iletim hatlarını

kullanarak İD'yi oksidatif stres yoluyla teşvik eder. Bu iletimler GLUT-4 ekspresyonu gibi gen düzeyinde, insülin duyarlılığını değiştirerek sinyal yollarında veya mitokondriyal fonksiyon üzerindeki etkileri ile gerçekleşebilir (28).

Adenozin 5'-monofosfat (AMP)-aktif protein kinaz (AMPK) birden farklı mekanizma ile glikolipit metabolizmasında görev alır. Glukoz metabolizmasında, AMPK'nın aktivasyonu, glukoneogenezle ilişkili genlerin ekspresyonunu doğrudan veya dolaylı olarak inhibe eder. Hepatik glukoneogenezi etkili bir şekilde inhibe etmesi kan glukoz konsantrasyonunu uygun aralıkta tutar (29). Lipit metabolizmasında ise AMPK, asetil-CoA karboksilaz (ACC), gliserol-3-fosfat asiltransferaz (GPAT), hormon duyarlı lipaz (HSL) ve CCAAT/enhancer bağlanma proteini alfa (C/EBP- α) gibi anahtar enzimleri veya transkripsiyon faktörlerini doğrudan fosforile ederek lipit sentezini ve katabolizmasını düzenler (30).

Karaciğerde glikoz ve lipit metabolizma bozukluklarının başlangıcını ve şiddetini etkilediği bildirilen birden fazla faktör vardır. Bunlarda NR'ler ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için sinyal yolu düzenleyicisi olarak hareket ederler. NR1 alt ailesi, peroksizom proliferatör aktivatör reseptörü alfa, beta/delta ve gama (PPAR α , β/δ ve γ), LXR- α ve - β , FXR ve pregnan X reseptörlerini (PXR) içerir (31). Bu elemanlar hepatik glikolipit metabolizması ile yakından ilişkilidir. Örneğin, hepatik LXR ifadesi, NAFLD şiddeti ile ilişkilidir. Antagonisti, steatoz ve fibrozisi hafifletebilir. Hepatik FXR ifadesi, NAFLD sırasında azalır ve agonisti olan obetolik asidin, NAFLD'li hastalarda histolojik özellikleri iyileştirdiği bildirilmiştir (21).

2.1.4. Glikolipit Mekanizması ve Kronik Hastalıkların İlişkisi

Glikoz ve lipitlerin sentezi, parçalanması, emilimindeki anormal süreçler glikolipit mekanizma ile kronik hastalıkların ilişkisinin temelini oluşturur. Bu metabolik süreçlerdeki aksama sonucunda moleküllerin aşırı ektopik birikimi görülür. Klinik hiperglisemi, dislipidemi, yağlı karaciğer hastalığı ve özellikle kardiyovasküler hastalıklar bu mekanizmalar sonucunda ortaya çıkabilir (19). Bu süreçler birçok inflamatuvar faktör, savunma hücresi, kan damarları, pankreas adacıkları, karaciğer ve yağ hücreleri gibi ilgili dokularda birbirleri ile etkileşim halinde devam eder. Karaciğerde görülen ilk glikolipit mekanizma bozulması insülin direncidir ve diğer kronik hastalıklar

takip eder. Hedef dokularda insülin uyarımına verilen bozuk yanıt T2DM, dislipidemi, kronik düşük dereceli inflamasyonla bağlantılıdır. Bu metabolik ilişki NAFLD ve ateroskleroza yol açabilir. Bu anlamda insülin direnci, hiperglisemi ve dislipidemi, T2DM, kardiyak sistemde morbidite ve mortalitenin öncüsü olarak kabul edilir (32).

Glikolipitlerin anormal metabolizmasına ise oksidatif stres, bozulmuş glikoz homoestazı ve mitokondri çalışma mekanizmasının bozulması gibi temel enerji yollarının neden olabildiği bildirilmiştir (3).

2.1.4.1. Reaktif oksijen türleri ve glikolipit aracılı kronik hastalıklar:

Oksidatif stres, serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki dengesizliktir. Reaktif oksijen türleri, süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) dahil olmak üzere moleküler oksijenden uzanan geniş bir oksidan grubu için genel bir terimdir. Sinyal iletiminin önemli bir faktörü olan ROS, glikoz/lipit metabolizması ve ilişkili hastalıklarda oksidatif stres aracılığı ile rol oynar (33). Enzimler ve mitokondriler olmak üzere vücutta ROS'un iki ana kaynağı vardır. Oksidatif stres adacık B hücrelerinde harabiyet yaratarak sayısını ve fonksiyonunu zayıflatır (34). Aynı zamanda GLUT-4 ekspresyonunu inhibe eder, sinyal yollarını bozar ve yetersiz glikoz alımını indükler. Böylelikle insülin duyarlılığı bozulur ve insülin direnci tetiklenir (35). Yani ROS, insülin direnci ile ilişkili mekanizmalarda insülinin üretimini, duyarlılığını ve kullanılabilirliğini azaltarak birden fazla mekanizma ile zarar verir. Sonucunda glikoz enerji için kullanılamaz, enerji için yağ asitleri kaynak olarak kullanılır. Hücrelerde lipitlerin kullanımında ve birikiminde artış olur. Bu lipotoksisite ve sonucunda NAFLD, ateroskleroz gibi ilişkili hastalıklar görülür. Özellikle kalp ve damar hastalıklarına giden lipotoksisite durumlarında bazı çalışmalar trigliseritlerin birikiminin başlı başına toksik olmadığını, bunun yerine kardiyak fonksiyonu bozan şeyin ROS'un aşırı sentezi olduğunu savunmaktadır (36-38). Bu çalışmalar ROS'un glikolipit aracılı kronik hastalıklar için tek başına bir risk faktörü olduğunu kanıtlamaktadır.

2.1.4.2. Mitokondri disfonksiyonu ve glikolipit aracılı kronik hastalıklar:

Sağlıklı hücrelerde, membran lipit bileşenleri lizozomların içinde hidrolize edilir. Sağlıklı olmayan hücrelerde ise lipitler serbesttir. Mitokondriyal zarların lipit bileşiminde görülebilecek değişiklik mitokondriyal işlev bozukluğuna yol açar (39).

Mitokondri membran potansiyelinin bozulması ve disfonksiyon ROS birikimiyle başlayabilir. Diğer taraftan ise ATP üretim sürecinin bir yan ürünü olarak mitokondri ROS üretir. Anoksi veya mitokondriyal işlev bozukluğu sırasında ise üretim artar. Bu süreçte insülin direnci, NAFLD gibi glikolipit aracılı kronik hastalıklar ROS ve mitokondri ile ortak bir mekanizmada buluşur (40). Örneğin, ROS mitokondri membran potansiyelini bozarak mitokondri disfonksiyonuna neden olur. Bu bozukluk insülin kullanımını ve duyarlılığını değiştirerek insülin direncine yol açar. Mitokondrinin enerji için yağ asidi oksidasyonuna aşırı yüklenmesi mitokondriyal ROS üretiminin artmasına neden olur. Mitokondriyal elektron taşıma zinciri kompleksi koordineli bir şekilde düzenlenemez ve ROS'un aşırı üretimi devam eder. Mitokondri disfonksiyonu nedeniyle görülen bu yağ asitlerinin abnormal oksidasyonu sonucunda NAFLD ve karaciğer fibrozu görülebilir (41).

2.1.4.3. Glikoz alımı ve glikolipit aracılı kronik hastalıklar: Glikoz metabolizması moleküler olarak, glikoz alımı, glikojen sentezi, glikojenoliz, glikoliz ve trikarboksilik asit döngüsü gibi birden fazla adımı içerir. İnsülin bu mekanizmdan merkezi bir role sahiptir. Hücre zarındaki insülin reseptörü substratını fosforile ederek (IRS1/2), fosfatidilinositol 3-kinaz/AKT (PI3K/AKT) yolunu aktive eder. Böylelikle glikozun doku alımını, glikojen sentezini destekler, lipit sentezini uyarır ve glukoneogenezi inhibe eder (42). İnsülinin hedef dokularda glikoz alımını sağlayamaması, insülin konsantrasyonunun glikoz alım sinyalini tetikleyemediği yönünde açıklanır. Bu mekanizma insülin direncinin ana mekanizmasıdır ve T2DM hastalarında sıklıkla görülür.

İnsülin dışı glikoz alım araçları insülin direnci üzerine yapılan çalışmalarda dikkat çekmiştir. Örneğin otofaji sırasında polisakkarit, glikoprotein ve glikolipit parçalanması, lizozomlarda glikoz birikimine neden olur (43). Benzer bir şekilde glukoneogenez ve glikojenoliz reaksiyonlarının son ortak basamaklarında glikoz-6-fosfat serbest glikoza hidrolize edilir (44). Glikozun organel lümeninde olduğu bu mekanizmalar için insülin sensitivitesi yeterli değildir ve glikoz taşıyıcıları gerekmektedir. İnsan sodyum bağımlı glikoz ko-taşıyıcı ailesi (SGLT) ve GLUT ailesi bu taşıyıcıların başlıcalarıdır. İnsülin bağımlı veya bağımsız glikoz alım mekanizmalarındaki bozulmalar ER stresi, mitokondriyal stres ve anormal yağ asidi metabolizması ile sonuçlanır (45,46). Reaktif oksijen türleri üretimi artar ve doğrudan

insülin direnci ve yüksek kan şekeriyle sonuçlanır. Böylelikle glikoz alımı ROS' un kısır döngüsü oluşur (47).

2.2. POLİFENOLLER

Polifenoller, bitkiler tarafından ikincil metabolitler olarak sentezlenen fenilpropanoidler olup en az 10.000 maddeden oluşan karmaşık bir kategoridir. Polifenollerin ve metabolitlerinin, oksidasyon, inflamasyon aracılı glikometabolizma ile ilgili çoklu sinyal yollarını düzenleyebileceği bildirilmiştir (48).

2.2.1. Polifenollerin Sağlık Üzerine Etkileri

Polifenollerin antioksidan, anti-inflamatuar gibi etkilerinin metabolik bozukluklardan ve kronik hastalıklardan korunmada yardımcı olabildiği bildirilmiştir. Sağlık üzerine olan en önemli etkilerinin antioksidan özellikleri olduğu düşünülmektedir. Polifenoller doğrudan radikal temizleme yetenekleri nedeniyle serbest radikalleri nötralize edebilir ve ilişkili hasarları önleyebilir (49). Oksidan süpürücü etkileri ile hücreleri ve bileşenlerini oksidatif zarardan koruyarak, oksidatif hasarla bağlantılı çoklu dejeneratif hastalıkların olasılığı azaltabilir (50). Polifenollerden zengin diyetlerin koroner hastalıklar, tümörler, osteoporoz, T2DM ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma sağlayabileceği bildirilmiştir (38,51).

Polifenollerin biyoaktif ajanlar gibi çalışarak hücrel inflamasyonu ve tümör anjiyogenezini baskıladığı da belirtilmektedir (13,52). İnflamasyon mekanizmasında iletişim yollarını bozarak interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi sinyal moleküllerinin oluşumunu inhibe edebilirler. Böylelikle inflamatuvar reaksiyonu hafifletme potansiyeline sahiptirler (11). Bununla birlikte nükleer faktör- κ B, MAPK'ler ve AKT/PI3K/mTOR gibi diğer inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu azaltarak inflamasyonu baskılamada da rol oynayabilirler (53). Bu mekanizmalar aracılığı ile hücre çoğalmasını, anjiyogenezi ve lökosit immobilizasyonunu kontrol edebilirler. Dolayısıyla bulaşıcı olmayan kronik hastalıklar, kanser başta olmak üzere COVID-19 salgınına kadar pek çok hastalık için hem koruyucu hem de tedavi edici özellikleri bulunmaktadır (11,54).

2.2.2. Polifenollerin Glikolipit Mekanizması Üzerine Etkisi

Polifenollerin glikolipit homeostazını ana işlev merkezi hepatik dokular olmak üzere düzenlediği gösterilmiştir. Polifenol içeriği yüksek bir diyet tüketiminin toplam kolesterol, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL) ve insülin direnci ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir (55). Polifenollerin lipit düşürücü etkilerinin temel olarak AMPK mekanizmasının aktivasyonu ile oluştuğu düşünülmektedir (56). Bu mekanizma ile SREBP-2 aracılı olarak hepatik hücre hattında önemli kolesterol baskılayıcı etki görülmüştür (57). Hücrel lipogenez yönetiminde LXR- α ile ilişkili yolun aktivasyonu da potansiyel bir yaklaşım olarak kabul edilir (58). Yapılan araştırmalar polifenollerin süpürücü reseptör sınıfı B üyesi 1 (SRB1) ve kolesterol 7 α -hidroksilaz (Cyp7- α 1) ekspresyonunu artırarak LXR- α aracılı mekanizmayı indüklediğini göstermektedir. Böylelikle glikoz intoleransının iyileştiği ve obez farelerin karaciğerindeki glukoneogenezle ilişkili enzimlerin inhibe edildiği belirtilmiştir (59,60). Bununla birlikte, hepatositlerde hem oksijenaz 1'i ve glutamat sistein ligazının anlatımını artırarak ekstraselüler sinyalle düzenlenen protein kinaz 2 (ERK2), nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf2), antioksidan yanıt elementi (ARE) sinyal yollarını önemli ölçüde aktive ettiği bildirilmiştir. Bu değişimler diyabet ve obeziteye karşı inhibe edici potansiyellerini göstermektedir (61). Polifenoller hepatik steatozda glukoneogenez ve lipogenezin baskılanması yoluyla hastalıkta gerileme sağlayabilirler. Çalışmalar bu mekanizmanın karaciğer glikoz üretimi aracılığı ile insülin direnci ve T2DM üzerine olumlu sonuçlar gösterebildiğini bildirmiştir (62,63).

Kısa zincirli yağ asitleri üretimini artırıcı etki de göstererek polifenoller glikolipit aracılı kronik hastalıkların önlenmesinde görev alabilirler. Bağırsakta asetik ve propiyonik asit konsantrasyonunun artırarak karaciğerde Nrf2 ekspresyonunu artırır. Bu yükselme ile hepatik antioksidan kapasitesi süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) ekspresyonu ile artar. İnflamatuar sitokinler IL-6 ve IL-1 β ekspresyonu azalır, lipit metabolizması düzenlenir (64). Polifenoller nod-benzeri reseptör ailesi, P3 (NLRP3), Pro-Kaspaz-1, Kaspaz-1 ve nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) gibi proteinlerin ekspresyonunu azaltır (65). Böylelikle NF- κ B/NLRP3 inflammatuar yolunu inhibe eder ve NAFLD üzerine olumlu etkiler gösterir (66). Polifenollerin glikoz alımı üzerine de GLUT-4 aracılığı ile etkisi vardır. Miyositlerde

glikoz kullanımını uyarmaya yardımcı olup, doğrudan ATP üretimini ve mitokondriyal biyogenezi artırır (67).

Güncel bir tedavi yaklaşımı olarak olarak, polifenollerin glikolipitlerle hazırlanmış lipozomlarda beraber kullanımının biyoyararlılığı artırdığı, daha az oksidatif özellik gösterdiği ve membran yapısında daha kararlı tutum sergilediği gösterilmiştir. Bu nedenle polifenollerle desteklenmiş glikolipitler ile hazırlanan lipozomların oksidatif stres ve inflamasyon aracılı hastalıklarda kullanılabileceğini göstermiştir (68).

2.2.3. Nar Polifenolleri ve Sağlık Üzerine Etkisi

Nar, değerli biyoaktif bileşiklerin zengin bir kaynağıdır. İçeriğindeki biyoaktif madde zenginliğinden dolayı kabuğu bir süper meyve atık ürünü olarak kabul edilir (69). Narın biyoaktif bileşenleri arasında şekerler, lipitler, yağ asitleri gibi birincil metabolitler ile tanenler, organik asitler, fenolik asitler, antosiyaninler, flavonoidler, vitaminler ve terpenler gibi ikincil metabolitler bulunur. Ana ikincil metabolitler, ellagitanninler ve gallotaninlerdir. Nar kabukları çok geniş bir aktivite spektrumuna sahip fenolik bileşikler olmak üzere potansiyel bir biyoaktif bileşik kaynağıdır (70). Nar kabuğundan elde edilen fenolik ekstraktların antioksidan, anti-kanser, anti-inflamatuar, lipit düşürücü, anti-hipertansif etkileri bildirmiştir (71).

Nar tüketiminin hemodiyaliz hastalarında, kan basıncı, serum trigliserit, LDL, HDL oksidatif stres ve inflamasyon üzerinde yararlı etkiler gösterdiği bildirilmiştir (72). Tip 2 diyabetli hastalarda, lipit profilini etkilemeden sistolik ve diyastolik kan basıncını düşürmüştür (73). Sağlıklı kişilerde ise nar tüketimi inflamatuvar sitokinler IL-6 ve TNF- α seviyelerinde azalmalarla sonuçlanmıştır (74). Narın antioksidan etkileri birden fazla mekanizmayla çalışır. Antioksidan enzim seviyelerini artırarak ROS'u azaltır, NF- κ B yolunu inhibe eder ve PPAR- γ 'yı aktive eder (75).

Nar kabuğu öztütlerinin yağ dokusunun miktarını azalttığını, 3T3-L1 yağ hücrelerinde PPAR- α ve PPAR- γ ekspresyonunu yükselttiğini, glikoz homeostazını ve lipit metabolizmasını iyileştirerek metabolik profili düzenlediği bildirilmiştir (76). Ek olarak AMPK aktivasyonu yoluyla yüksek yağlı diyetle indüklenen kardiyak trigliserit ve kolesterol birikimini azaltır. PPAR- γ ve GLUT4 ekspresyonunu artırarak insülin duyarlılığını iyileştirdiğini vurgulamıştır (77). Nar kabuğu polifenollerinin

değerlendirildiği bir çalışmada, serbest radikalleri temizleme, yağ oksidasyonunu önleme ve oksidatif stres altında elajik asitin (EA), punikalajinden daha etkili olduğu gösterilmiştir (78).

2.2.4. Elajik Asitin Fizikokimyasal Özellikleri, Biyoyararlanımı ve Glikolipit Mekanizması Üzerine Etkisi

Elajik asit, üzüksü meyve ailesi ve nar başta olmak üzere çeşitli bitkilerde elagitanninler olarak bulunan polifenolik bir antioksidandır. Gallik asidin dimerik bir türevi olup serbest formunda glikozit olarak bulunmaktadır. Fizikokimyasal açıdan, 360°C'nin üzerinde bir erime noktasına, 796,5°C'lik bir kaynama noktasına, 1,05'lik bir log P'ye, 302,197 g/mol değerinde bir moleküler ağırlığa sahiptir. Kristal toz formundadır. Elajik asit farklı substratlardan elektronları kabul etme ve antioksidan redoks reaksiyonlarına katılma yeteneğine sahiptir (79).

Elajik asit, terapötik etkileri olan polifenolik aktif bir bileşik olmasına rağmen çözünürlüğü ve geçirgenliği düşüktür (Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi IV) (80). Elajik asit gastrointestinal sıvılarda yeterince çözünemez, gastrointestinal membrandan dolaşım sistemine geçemez. Bu nedenle oral uygulamadan sonra yeterli miktarlarda hedefe ulaşamamaktadır. Emilebilen EA, ilk geçiş metabolizması sırasında, metil esterlere, dimetil esterlere ve glukuronidlere dönüştürülerek hızla idrarla atılmaktadır (81). Emilmeyen EA ise bağırsak mikrobiyotası tarafından emilimi yüksek olan ürolitinlere dönüştürülmektedir. Ürolitinlere atfedilen sağlık etkileri, EA'nın etkilerine yakındır (82). Sağlıklı gönüllülerle yapılan bir çalışma daha yüksek serbest EA alımının biyoyararlanıma bir etkisi olmazken ürolitin üretimini artırdığını göstermiştir (83). Teropatik etkilerinin ümit vadetmesi nedeniyle ellajik asitin biyoyararlanımı artırmak adına yapılan çalışmalar devam etmektedir (84,85).

Elajik asit birden fazla moleküler mekanizmaya etki etmektedir. Serbest radikallere karşı hem radikal süpürücü hem de koruyucu olarak çalışır. Başta 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat (ABTS) serbest radikalleri olmak üzere pek çok oksidan üzerinde süpürücü etkisini göstermektedir (86). Doku ve DNA hasarından sorumlu olan radyal hidroksilin endojen üretimini azaltır. Serbest radikallerin üretiminde yer alan Fe^{2+} ve bakır iyonları gibi metal iyonlarını şelatlayarak oluşumunu engellemektedir (87). Koruyucu etkisini ise karaciğer detoksifikasyon mekanizması aracılığı ile göstermektedir. Faz I ve faz II

metabolizmasının indüksiyonunda detoksifiye edici bir enzim olarak önemli bir rol oynayan Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1'i (Keap1) azaltarak oksidatif strese karşı koruyucu etki göstermektedir (88).

Araştırmalar, EA'nın T2DM'de hiperglisemiye iyileştirdiğini, kan glikoz seviyelerini düşürdüğünü, GLUT4 ve PPAR- γ ekspresyonunu artırdığını, pankreas beta hücrelerini ROS'a karşı koruduğunu ve insülin direncini iyileştirdiğini göstermiştir. Serum glikoz seviyelerini AMPK mekanizması ile de azalttığı gösterilmiştir (89,90). Ek olarak EA'nın T2DM'li farelerde glukokinaz ve glikoz-6-fosfataz aktivitelerini azaltarak önemli bir hipoglisemik etki gösterdiği bildirilmiştir (91). EA uygulanan farelerde açlık glikoz seviyelerinde azalma ve serum adiponektininde artış gözlemlenmiştir (92). Ek olarak, PPAR- γ ve CCAAT/artırıcı bağlayıcı protein- α proteininin ekspresyonunu artırarak, trigliserit ve total kolesterol konsantrasyonunu azaltır (93). Bununla birlikte EA, SIRT1, AMPK, SREBP1, PPAR mekanizmalarını düzenleyerek, karaciğerde trigliserit ve kolesterol seviyelerini düzenleyip, lipid metabolizmasını iyileştirdiği bildirilmiştir (94). Bununla birlikte elajik asitin NF- κ B aktivitesini inhibe ettiği ve serum TNF- α ve IL-6 miktarını azaltarak anti inflamasyon yollarıyla glikolipit örüntülü hastalıkların oluşum riskini azalttığı bildirilmiştir (95).

2.3. SİRKADİYEN RİTİMLER

Sirkadiyen ritimler, yaklaşık 24 saat süren, hayvanlar, bitkiler, bakteriler gibi çeşitli canlı organizmalarda çalışan endojen döngülerdir. Sirkadiyen sistem girdiler, osilatörler ve çıktılar olmak üzere üç bileşenden oluşur. Çıktı olarak, humoral, metabolik ve sinirsel sinyaller üretilir. Vücuttaki çok sayıda saat böylelikle senkronize edilerek, biyolojik süreçlerin tutarlı bir ritmik organizasyonu oluşturulur (96).

2.3.1. Sirkadiyen Ritimlerin Temel Bileşenleri

Sirkadiyen ritimler sistemik ve hücrel olmak üzere iki düzeyde çalışır. Sistemik ölçekte, ışık önemli bir giriş sinyalidir ve ana merkez olan SCN'yi sıfırlar. Ana işlevi, beyni ve periferik dokuları sinyallerle koordine etmektir. Melatonin ve glukokortikoidler ve katekolaminler gibi endokrin sinyallerin sirkadiyen salgılanmasını hipotalamus-hipofiz-adrenal eksenini aracılığıyla düzenlemektedir (8).

Hücresel düzeyde ritimler, osilatörler ile birbirine bağlı negatif geri besleme döngülerinden oluşmaktadır. Memelilerde, transkripsiyon faktörleri sirkadiyen lokomotor çıktı çevrimleri kaput (CLOCK) ve beyin ve kas ARNT benzeri 1 (ARNTL; BMAL1) ile heterodimerler oluşturmaktadır. Işık varlığında bu genler sirkadiyen protein homologları 1, 2 ve 3'ü (PER1, PER2 ve PER3) ve kriptokromlar 1 ve 2'yi (CRY1 ve CRY2) kodlayan genlerin ifadesini yönlendirmektedir (97). Işık azalmaya başladığında PER ve CRY proteinleri heterodimerleşir, CLOCK/BMAL1 ile etkileşime girerek, bunların transkripsiyonel aktivitelerini baskılamaktadır. Sonuç olarak, ışık döngüsüne bağlı olarak negatif geri beslemeli baskılama yaklaşık 24 saatlik hücresel ritimler oluşturmaktadır (98).

Sirkadiyen döngüler hücre tipi-spesifik transkripsiyon faktörleri, transkripsiyon yardımcı düzenleyicileri ve epigenetik aktiviteleri içeren karmaşık bir döngüdür. Bu ağ, çeşitli dokularda bulunan çok sayıda genin ekspresyonunu düzenlemektedir (99). Örneğin, CLOCK-BMAL1 aktivitesinin baskılanmasıyla, hepatik glukoneojenik programlama ve lipid metabolizmasında yer alan genleri düzenleyen hepatosit nükleer faktör 4-alfa (HNF4- α) transkriptinin ifadesinin artabileceği bildirilmiştir. Transkripsiyon ve translasyon sonrası mekanizmaların da tüm organizmalarda ritimleri düzenleyebilecek rollere sahip olduğu ileri sürülmektedir (100). Bu nedenle 'saat kontrollü genler' olarak tanımlanan sirkadiyen genlerin hücre fizyolojisi ve metabolizması için gerekli olduğu fikri hakimdir (101).

2.3.2. Sirkadiyen Ritim Bozukluklarının Metabolik Etkilerinin ve Kronik Hastalıklarla İlişkisinin İncelenmesi

Sirkadiyen ritimler metabolik sağlığı korumak için önemlidir. Glikoz ve lipid metabolizması dahil olmak üzere hepatik metabolik süreçler ile sirkadiyen ritim ilişkisi oldukça dinamikdir. Bu döngü genetik faktörlerin yanı sıra, vardiyalı çalışma, kronik jet lag, geceleri ışığa maruz kalma, uyku kısıtlaması ve kötü beslenme gibi çevresel koşullardan da etkilenir (102). Ritmin bozulması, artan oksidatif stres, obezite, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve NAFLD dahil olmak üzere pek çok kronik hastalığı içeren sonuçlara neden olabilmektedir (103).

Sirkadiyen ritim ile oksidatif stres arasında çift yönlü bir ilişki vardır. Redoks durumundaki değişiklikler çekirdek saat fonksiyonunu etkileyebilir, saat proteinleri de hücrelerin redoks homeostazını düzenleyebilir (104). Örneğin, BMAL1/CLOCK'un

DNA'ya bağlanması, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD(H)) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP(H)) oranına bağlıdır. Yeteri kadar NADPH sağlanamadığı oksidatif durumlarda pentoz fosfat yolu inhibisyonu glutatyon üretiminin azalmasına neden olmaktadır. Artan oksidatif stres pek çok hastalığın patafizyolojisinde yer almaktadır (105).

Sirkadiyen ritim bozukluğunun farklı mekanizmalarla glikoz toleransını etkilediği gösterilmiştir. İnsülin, glukokortikoidler, ghrelin, inkretinler, adiponektin ve leptin gibi metabolik hormonlar ile sirkadiyen ritimler arasında çift yönlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir. İnsülin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) PER indüksiyonu ile sirkadiyen ritmi bozabilir. Yanlış zamanlanmış insülin sinyallemesi ise saat gen ifadesini AMPK aracılığı ile bozabilir (106). Sirkadiyen saat mekanizması glikozu hücresel düzeyde de düzenlemektedir. Sirkadiyen genler CLOCK ve BMAL1'deki negatif mutasyonlar GLUT2 ekspresyonunu azaltmakta ve hepatik glikoz metabolik genlerinin ekspresyonunda ritmik kayba yol açmaktadır. Böylece hipoglisemi, hipoinsülinemi aracılığıyla glukoneogenez sistemi bozulmaktadır (107).

Lipit metabolizmasının organizasyonu da SCN tarafından düzenlenmektedir (108). Bu düzenleyici yollardaki işlev bozukluğu NAFLD'ın patofizyolojisinin bir parçasıdır. Hastaların hepatositlerinde lipit birikiminin ana nedenlerinden biri novo lipogenezin düzensizliğidir. Karaciğerde SREBP-1c'nin aşırı ekspresyonu alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), hepatik trigliserit düzeyleri ve serum serbest yağ asitleri artışıyla ilişkilidir (109). SREBP-1c'nin, BMAL1 gibi sirkadiyen saat genleri tarafından düzenlenebildiği bildirilmiştir. Ek olarak PPAR- δ 'nın hepatik lipogenezin sirkadiyen ritmini düzenlediği bildirilmiştir (110). Bununla birlikte kolesterolü safra asitlerine dönüştüren yoldaki hız sınırlayıcı enzim olan Cyp7- α 1'in ritmik ekspresyonunu sirkadiyen ritimler düzenlemektedir. Ekspresyonun azalması nedeniyle karaciğerde daha yüksek miktarda kolesterol birikimi görülmüştür (111).

2.3.3. Sirkadiyen Ritimlerin Glikolipit Metabolizmasına Etkisi

Sirkadiyen ritim bozukluğunun, glikolipit metabolizmasıyla ilişkilendirilen obezite ve insulin direnci gibi çeşitli metabolik bozukluklara neden olabileceği gösterilmiştir. Lipit, glikoz biyosentezi ve katabolizmasının birçok düzenleyicisi sirkadiyen ritimler aracılığıyla düzenlenmektedir (112). Yağ dokusunda çekirdek

saatin ritmi belirleyicidir. Yağ hücresine özgü BMAL1'in delesyonu, dinlenme aşamasında dislipidemiye yol açmaktadır (113). Lipojenik genlerin promotörlerine BMAL1-CLOCK'un bağlanabileceği ve uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin sentezini düzenleyerek hipotalamusa geri bildirimde bulundukları bildirilmiştir (108). Yağ dokusunun lipolitik aktivitesi de lipaz ve hormona duyarlı lipazın sirkadiyen sinyallerle düzenlenmektedir. Çekirdek saatin bozulması lipolitik oranın azalmasına, daha büyük lipid damlacıkları ve adipositlerde hipertrofi eğiliminin artmasına neden olmaktadır (114). Glikoz homeostazının bileşenlerinden glukoneojenik gen ifadesinin sirkadiyen ritimlerle düzenlendiği de bildirilmiştir (10).

Glikolipit mekanizmasının bileşenleri olan lipid metabolizması ve glikoz metabolizması sirkadiyen ritimlerle birbirine bağlanmaktadır. Bozulmuş lipid metabolizması ritimleri insülin sinyalini bozarak seramid gibi lipidlerin ektopik birikimine yol açmaktadır. Böylece AMPK aktivasyonunun azalmakta ve insülin direnci oluşmaktadır. Tüm bu metabolik kanıtlar ile sirkadiyen ritimlerin glikolipit metabolizma homeostazını korumadaki önemli rolü açıklanmaktadır (115).

2.3.4. Fenolik Bileşenlerin Glikolipit Mekanizması Üzerine Etkisinin Sirkadiyen Ritmik Genler Ekseninde İncelenmesi

Glikolipit metabolizmasını sirkadiyen ritimler aracılığı ile düzenlemek için fenolik bileşiklerin kullanılabileceği bildirilmiştir. Çay polifenollerinin en güçlü aktif bileşeni olan epigallocateşin gallat (EGCG), BMAL1 aracılığıyla insülin direncinin metabolizmasında önemli iyileştirici etkilere sahiptir (116). EGCG tirozin-fosforile edilmiş IRS-1 seviyesini artırarak GLUT-2'yi kodlayan genin transkripsiyonunu teşvik etmektedir. Beyin ve kas ARNT benzeri 1' e bağımlı bir mekanizma aracılığıyla PI3K/AKT ve AMPK yolunu aktive ederek insülin direncini iyileştirebilmektedir (117). Ek olarak, glukozamin tarafından uyarılan ROS'un salınımını önemli ölçüde azaltarak HepG2 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasını önleyebildiği gösterilmiştir (118). Bununla birlikte, EGCG karaciğer ve yağ dokusunda SIRT1 peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama koaktivatörü 1-alfa (PGC1- α) halkasını kontrol etmektedir. Bu mekanizma yağ asidi sentezinde azalmaya, karaciğer β -oksidasyonunda artışa neden olmaktadır. Ek olarak kahverengi yağ dokusunda enerji tüketimini artırdığı ileri sürmüştür (119).

Flavonoid polifenolik bir bileşik olan resveratrol, CLOCK-BMAL1 kompleksindeki negatif geri bildirim faktörlerinin etkileşimini doğrudan etkilememektedir. Fakat çekirdekteki SIRT1 aktivitesini etkileyerek CLOCK-BMAL1 kompleksi tarafından aracılık edilen transkripsiyonel aktivasyonu negatif olarak düzenleyebilmektedir. Böylelikle insülin duyarlılığını artırmaktadır (120). Resveratrolün HepG2 hücrelerinde, BMAL1'e bağlı bir şekilde serbest yağ asidi kaynaklı hücre içi lipid metabolizması dengesizliğini kontrol ettiği bildirilmiştir (121).

Acı biberlerin aktif bir bileşeni olan kapsaisinin hücre zarındaki vanilloid alt familyası üyesi-1 (VR-1) reseptörüne bağlanarak, hücredeki mitokondrinin zar potansiyelini ve enerji harcamasını değiştirebilmektedir. Böylelikle hücrede BMAL1 transkripsiyonunun ritmik salınımına neden olmaktadır (122).

Berberin ise, C3H10T1/2 kahverengi yağ hücrelerinde, doza bağlı bir şekilde fibroblast büyüme faktörü 21 (FGF21) gen anlatımını artırabilir. Bu metabolizma BMAL1'in aktivitesine bağımlı olarak çalışmaktadır (123). Periferik glikoz toleransı ve lipid homeostazının önemli bir metabolik düzenleyicisi olan FGF21, PPAR- γ yoluyla reseptörleri aktive etmektedir. Adiponektin geninin anlatımını ve adiponektin salgılanmasını artırabilir. Sonucunda kan şekeri seviyelerini düşürmekte, insülin duyarlılığını ve lipid anormalliklerini iyileştirmektedir (124).

Üzüm çekirdeği prosiyanidin özütü, mitokondriyal dinamikleri ve miRNA'ları düzenleyebilmektedir. Karaciğerle ilişkili metabolik hastalıkları iyileştirmek için bir hepatik saat geni düzenleyicisi olarak hareket edebilmekte ve bu etki karaciğer sirkadiyen mekanizmaları ile gerçekleşmektedir (125). Prosiyanidin özellikle karaciğer saat faktörlerinin (BMAL1, Per2, Cry1 ve RoR- α) ritmini geri kazandırabilmektedir. Işık yoksunluğunda yapılan tedavinin daha belirgin bir etki sağladığı bildirilmiştir (126).

Nobiletin, palmitik asit tarafından indüklenen fare hepatositlerinde, CLOCK ve BMAL1 genleri de dahil olmak üzere sirkadiyen ritim salınımlarının yeniden şekillenmesini hafifletebilir ve lipid anormalliklerini iyileştirebilmektedir (127).

2.3.5. Elajik Asitin Glikolipit Metabolizması Üzerine Etkisinin Sirkadiyen Ritmik Genler Ekseninde İncelenmesi

Elajik asit antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflamatuvar, hepatoprotektif, kardiyoprotektif, kemopreventif, nöroprotektif, gastroprotektif ve antidiyabetik özelliklerle ilişkilendirilmiştir (128). Glikolipit metabolizması üzerine etkileri incelendiğinde EA'nın AMPK aktivasyonunu artırarak serum glikoz seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir (129). Ek olarak, PI3K/Akt/FOXO3 sinyal yolunu aktive edip PPAR- γ ve IGF-1'in ifadesini düzenleyebilmektedir. Bu yolla beyaz yağ dokusunda sistemik inflamasyonu iyileştirdiği, lipit metabolizmasını ve insülin duyarlılığını artırdığı, serum glikoz konsantrasyonunu azalttığı bildirilmiştir (130). Önemli etkilerinden bir tanesi de insüline duyarlı gen kaspaz 3'ün ifadesini azaltarak, beta hücrelerinin harabiyetini azaltıp sayılarını ve fonksiyonlarını iyileştirebilmesidir (131). Bununla birlikte hem SRB1 indüksiyonunu hem de köpük hücre oluşumunu baskıladığı bildirilmiştir. Karaciğerde SIRT1, AMPK, SREBP1, PPAR ve AMPK düzenlemeleri ile lipit metabolizmasını iyileştirebilir (132). EA ile birlikte türevi olan ürolitin ile yapılan bir çalışmada AMPK veya SIRT1 aktivasyonu yoluyla sirkadiyen ritimlerin gen ekspresyon fazını değiştirdiğini göstermiştir (133). EA ve ürolitin sirkadiyen genlerin ekspresyon ritimlerini uzatmanın yanı sıra genliklerini de artırdıkları gösterilmiştir. Meşe özleriyle yapılan bu çalışmada daha yüksek EA dozlarının, bu etkileri daha olumlu yönde artırabileceği düşünülmüştür (12). EA'nın glikolipit mekanizmasındaki yolu pek çok mekanizma ile gösterilmiştir. Bu çalışmalarda etki ettiği bildirilmiş olan genler sirkadiyen ritimlerin genleri aracılığıyla çalışmasına rağmen bu iki mekanizmanın ortak prensipleri aydınlatılmamıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN SARF, KİMYASAL VE CİHAZLAR

Yapılan çalışmada kullanılan cihazlar; karbondioksitli inkübatör (PHCBI, Hollanda), soğutmalı santrifüj (Eppendorf, Almanya), soğutmalı mikrosantrifüj (Eppendorf, Almanya), vorteks (Weightlab, Türkiye), saf su cihazı (Merck-Millipore), su banyosu (Thermomac, Amerika Birleşik Devletleri), buz makinesi (HIMS-50, Çin), derin dondurucu (-86°C) (Binder, Almanya), +4°C buzdolabı (Uğur, Türkiye), -20°C buzdolabı (Uğur, Türkiye), plaka okuyucu (Thermo, Multiscan Go, Finlandiya), spektrofotometre (Eppendorf, Almanya), real-time PCR cihazı (Analitik Jena, Almanya), PCR cihazı (Thermo, Amerika Birleşik Devletleri), hücre görüntüleme mikroskobu (BioRad, Amerika Birleşik Devletleri), biyogüvenlik kabini (Euroclone, İtalya), otomatik pipet seti (Eppendorf, Almanya), otoklav (Nüve, Türkiye) ve tartım cihazıdır (Shimadzu, Japonya). Ek olarak Euroclone SybrGreen Master Mix (İtalya) kiti gen ifadelerinin belirlenmesinde, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) (Merck, Almanya), glikozamin (Sigma, Almanya), glikoz alımı kiti (Elabscience, Amerika) hücre toksisite testinde, Analitik Jena RNA izolasyon kiti (Almanya) RNA izolasyonunda kullanılmıştır. Hücre kültürü besiyeri için ise DMEM (Sigma, Almanya), penisilin/streptomisin (Sigma, Almanya), FBS (Sigma, Almanya), dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma, Almanya), fosfat tamponu (PBS (Sigma, Almanya), %0.25'lik Tripsin-EDTA (Sigma, Almanya) kullanılmıştır. Elajik asit (Sigma, Almanya) firmasından satın alınmıştır.

3.2. HÜCRE BÜYÜME KOŞULLARI

HepG2 hücreleri T25 flasklar kullanılarak büyütülmüştür. Bu işlemler için uygun atmosfer 37°C'de %5 CO₂ atmosferde %95 nemlendirilmiş bir ortamla inkübasyonla sağlanmıştır. İnkübasyonda hücreler %90 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS), %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin ile muamele edilmiştir. Ortam değişimi her 2-3 günde bir yapılan pasajlama ile sağlanmıştır.

3.3. HÜCRELERİN PASAJLANMASI

Hücreler 37°C’de %5 CO₂ atmosferindeki inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin %80-90 konfluent olduğu gözlemlendikten sonra PBS ile yıkanmıştır. Tripsinize işlemi %0.25 tripsin-EDTA ile yapılarak, 3 dakika 37°C inkübatörde bekletilmiştir. Ardından tripsin inaktivasyonu için flasklara Tripsin/EDTA miktarının 3 katı miktarda serum içeren besiyeri verilmiştir. İnaktivasyon sonrası yüzeyden kalkan hücreler süspanse edilip, 15 mL tüpe aktarılmıştır. Tüpler 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek pellet oluşumu gözlemlenmiştir. Santrifüj tamamlandıktan sonra süpernatant uzaklaştırılıp yeni besiyeri ile pellet çözündürülmüştür. Hücre sayımı yapılmıştır. Sayım tamamlandığında talep edilen miktarda hücreler deney doğrultusunda uygun görülen flasklara veya kuyucuklara ekilmiştir.

3.4. HÜCRE SAYIMI

Hücre sayımı işlemi hemositometre kullanılarak yapılmıştır. Eşit miktarda (200 µL) hücre süspansiyonu ve PBS karıştırılıp, 50 µL tripan mavisi karışıma eklenmiştir. Homojenize edilmiş olan hücreden 10 µL sayım için kullanılmıştır. Thoma lamının üzerine yerleştirilen lamel ile thoma lamı arasına karışım kenardan yavaşça aktarılmıştır. Mikroskopta (Biorad, Amerika Birleşik Devletleri) 4 alan sayılmıştır. Sayımın ardından ortalaması alınmış ve mL’deki hücre sayısı; 4 alanın ortalaması×Dilüsyon Faktörü×10⁴ formülü ile hesaplanmıştır.

3.5. HÜCRE CANLILIK TESTİ

Hücre canlılığı MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) yöntemi ile belirlenmiştir. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara 5x10³ kuyucuk başına olarak ekilmiştir. İnkübasyon süresi olan 24 saat sonunda besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak farklı konsantrasyonlarda (0-1000 µM) elajik asit içeren taze hazırlanmış besiyeri eklenmiştir. Glikozamin uygulaması için de canlılık testi yapılmıştır ve farklı konsantrasyonlarda (0-50000 µM) glukozamin içeren taze hazırlanmış besiyeri eklenmiştir. Canlılık testi 24 ve 48 saat için gerçekleştirilmiştir. Süre tamamlandığında ortam 1 mg/ml MTT içeren (PBS içinde çözündürülmüş) 100 µl taze ortam/kuyucuk ile değiştirilmiştir. Hücreler 37°C’de karanlıkta inkübatörde 3 saat daha inkübe edilerek, her kuyucukta mor renkli formazan kristali gözlemlenmiştir. Ardından besiyerleri atılmış ve her bir kuyucuğa 100 µl DMSO ilave edilmiştir. Hazırlanan bu çözeltinin absorpsansı 570

nm'de mikropilaka okuyucu (Thermo Scientific, Finlandiya) ile ölçülmüştür. Canlılık; Canlılık yüzdesi=(işlenmiş numunenin absorbansı/muamele edilmemiş numunenin absorbansı) x100 formülü ile ifade edilmiştir.

3.6. İNHİBİTÖR KONSANTRASYON 50 (IC₅₀) DEĞERİNİN BELİRLENMESİ

Hücre canlılık testinin sonucunda, HepG2 hücresinde etkili inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) belirlenmiştir. Elde edilen sonuç diğer analizlerde kullanılmıştır. Bu amaçla EA ve glikozamin için uygulanan doz değerleri Graphpad Prism programına girilip IC₅₀ dozu belirlenmiştir.

3.7. RNA İZOLASYONU

Uygulamadan sonra HepG2 hücreleri toplanmak üzere, altı kuyucuklu plakalara 3x10⁵ kuyucuk başına olacak şekilde kültüre edilmiştir. Control olarak kullanılan hücrelerden, sadece IC₅₀ değerinde EA uygulanan hücrelerden ve IC₅₀ değerlerinde glikozamin ile beraber EA uygulanan hücrelerden RNA izole edilmiştir. RNA izolasyonu üretici firma talimatlarına göre RNA izolasyon kiti (innuPREP RNA mini kit 2.0 (Analytik Jena)) kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan kit trizol yöntemine dayanmaktadır. Elde edilen RNA'nın konsantrasyonu 260 nm'de absorbans ölçülmüştür. Konsantrasyon (µg/ml)=A₂₆₀×seyreltme faktörü×40 µg/ml formülü kullanılarak hesaplanmıştır. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı ile RNA saflığı belirlenmiştir. OD₂₆₀/280 oranı 1,7-2,2 arasında olan RNA'lar kullanılmıştır. İzole edilen RNA'lar -20°C'de RT-PCR yapılana kadar bekletilmiştir.

3.8. cDNA SENTEZİ

Yapılan çalışmada RNA'dan izole edilecek cDNA sentezi için cDNA Reverse Transkripsiyon kiti (SensiFAST™ cDNA Sentez Kiti) kullanılmıştır. İşlem basamakları kit üreticisi firmanın kullanım kılavuzunda gösterilen aşamalar takip edilerek tamamlanmıştır. PCR yapılana kadar cDNA ürünleri -20°C'de saklanmıştır. Elde edilen her bir numune cDNA'dan kullanılarak Sybr Green PCR Master Mix ve primer çifti protokollere uygun miktarlarda eklenmiştir. BioRad cihazı CD36, PPAR- γ, HMGCR, APOA1, LDLR, CRY1, CRY2, NR1H3, NR1H2, MTNR1A, STAT3, SREBF1, SIRT1, PER1, PER2, CLOCK, BMAL1, PPAR-α, PPARGC1A, GLUT4 gen ifadelerinin gerçek

zamanlı PCR ölçümü için kullanılmıştır. cDNA sentezi için belirlenen koşullar 25°C'de 10 dk, 45°C'de 15 dk, 85°C'de 5 dk ve 4°C'ye getirilerek cihazda inkübasyona bırakılmıştır. İşlemler sonucunda elde edilen cDNA'lar -20°C'de RT-qPCR için muhafaza edilmiştir. Primer çiftleri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> sitesinde yer alan yazılım ile BLAST yapılarak PCR çalışmaları için hazırlanmıştır. Tasarlanan primerler ticari firma tarafından sentezlenmiştir. İncelenen genlerin primer dizileri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Primerlerden 100 µmol/µl stok nükleaz içermeyen steril su ile çözülerek yapılmıştır. Hedef genlerin relatif transkripsiyon seviyeleri beta aktin ve GAPDH genlerine normalize edilerek hesaplanmıştır. Amplifikasyonlar 20 µL toplam reaksiyon hacmi içerisinde SYBRGreen Master Mix kullanılarak, bölgeye özgü ileri-geri yönlü primerler ve cDNA ile gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı PCR için primerler; 1 µL, SYBR green master mix; 10 µL, su; 8 µL, cDNA; 1 µL olarak kullanılmıştır. Analitik Jena RT-PCR cihazı (Analitik Jena, Almanya) kullanılarak elde edilen cDNA RT-qPCR analizine tabi tutulmuş ve sonuçlar analiz edilmiştir. DNA örneklerinin seçilen primerler ile çoğaltılması için PCR deneyinde, OneTaq®2X Master Mix with Standart Buffer kiti kullanılmıştır. Master mix, Taq polimeraz enzimi ve Taq polimeraz tamponu deoksinükleotidleri (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) içeren karışımdır. Bu karışıma, komplementer DNA (cDNA) ve nükleaz içermeyen steril su eklenerek, 0.2 ml'lik ependorf tüplere PZR karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 3.1: İncelenen genlerin primer dizileri

Gen	Forward primer	Reverse primer
MTNR1A	TGGCCATTATCCGTACCCG	GAGGGAGTTCTTGCTGCTGT
STAT3	CTGCCCCATACCTGAAGACC	TCTGCAGCTTCCGTTCTCAG
SREBF1	ACAGCCATGAAGACAGACGG	ATAGGCAGCTTCTCCGCATC
SIRT1	ACATTTTCCATGGCGCTGAG	AGTCCCAAATCCAGCTCCTC
CD36	TGGTACAGATGCAGCCTCAT	AGGCCTTGATGGAAGAACA
PPAR- γ	GACCACTCCCACTCCTTTGA	ATGAGGGAGTTGGAAGGCTC
HMGCR	CCGTAATGGCTGGGGAATTG	TGCCCATGTTCCAGTTCAGA
APOA1	GTGTCCCAGTTTGAAGGCTC	CATCTCCTCCTGCCACTTCT
LDLR	TCAGTGACTATTCTCGGGG	AAGTGACACCCATCTCCCAG
CRY1	CTTCGTCAGGAGGGTTGGAT	GACAGCCACATCCAACTTCC
CRY2	AAGCATGGGATTCTGGAGGC	CTCAGTCCCAGAAGCCCAAG
NR1H3	ACTTCACTGAGCTGGCCATC	ACTCTCACTCCCAGGGTTGT
NR1H2	TGACCACCCTCCAGCAGATA	TGCTGGGCTTGAGGTGTAAG
GLUT4	GCAGTTTGGGTACAACATTGGG	TGAGGAAGGAGGAAATCATGCC
BMAL1	CCCTGTTGACTTTAGTGACTTGCC	GTATCAATGGCTCTGAGATGGC
CLOCK	GCTGTAGTTGTTGGTCATTGCC	TCTAAGGCTTCCTGAACAAGGG
PER1	CTGTGATCGAACTTCTCAACCC	CTTGAACCATTGCTGTTGGC
PER2	ACCAACACATGTGAGACCCA	AGGTCGGGCTCATGAAAAGA
PPAR- α	ACATCTGTGGCAGAAAAGGC	GGTCACGGGATGATTTAATGGC

3.9. GLİKOZ ALIMI DENEYİ

Yapılan çalışmada glikoz alımı deneyi için Elabscience (Texas, Amerika) glikoz alımı kiti kullanılmıştır. Hücreler kuyucuk başına 2000 hücre yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakaya ekilerek 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Süre tamamlandığında insülin direnci oluşturmak için hücreler 5 mM glukozamin ile muamele edilmiştir. Ardından 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre tamamlandığında hücreler serum içermeyen besiyeri ile 2 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin ardından farklı konstrasyonlarda (10-25-50 μ M) elajik asit ile hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. Son aşama olarak hücrelere 100 nM insülin verilmiş, 20 dakika bekletilmiştir. İşlemler tamamlandığında kullanılan kitin kılavuzuna bağlı kalınarak hücreler 200 μ l %2 BSA içeren KRPH çözeltisiyle iki kez yıkanmıştır. Kuyucuklara 10 μ l 10mmol/L-DG

eklenmiştir. Kontrol kuyucuğuna 10 µl KRPH çözeltisi eklenmiş ve 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından hücreler 100 µl KRPH çözeltisi ile 3 kez yıkanmış, 50 µl reaktif 1 eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre dolduğunda 50 µl reaktif 2 eklenmiştir. Standart kuyucuklarına kit prosedürüne göre uygun konsantrasyonlarda hazırlanmış 30 µl standart eklenmiştir. Örnek içerecek kuyucuklara her bir muamele edilmiş kuyucuktan 30 µl eklenmiştir. Her bir kuyucuğa 170 µl reaktif 4 çalışma solüsyonu eklenmiştir. İnkübasyon 37°C'de 30 dakika boyunca devam etmiştir. Eksitasyon dalga boyu 530 nm ve emisyon dalga boyu 590 nm olarak kullanılmış, her bir kuyucuğun floresan yoğunluğu ölçülmüştür. Glikoz alım oranları elde edilen standart eğriden hesaplanmıştır.

3.10. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ TAYİNİ

Yapılan çalışma oksidatif stresi belirlemek için Elabscience (Texas, Amerika) ROS florometrik analiz kiti kullanılmıştır. Hücreler 6 kuyucuklu plakaya 2×10^5 hücre yoğunluğunda ekilerek 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 5 mM glukozamin ile farklı konsantrasyonlarda elajik asit (10-25-50 µM) verilmiş ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından kitin kullanım kılavuzunda belirtilen basamaklar takip edilmiştir. Reaktif hazırlığı DCFH-DA çalışma çözeltisinin hazırlanması ile başlatılmıştır. Serumsuz ortam ile 10 mmol/L DCFH-DA seyreltilmiştir. Hücrelere DCFH-DA çalışma çözeltisi eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından $1000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve 3 kez yıkanmıştır. Elde edilen pellet deney için toplanmıştır. Toplanan hücreler yeniden süspansiyon haline getirilmiş ve uyarma dalga boyu 500 nm, emisyon dalga boyu ise 525 nm olmak üzere ölçülmüştür.

3.11. MİTOKONDİRİ MEMBRAN POTANSİYELİ DENEYİ

Mitokondri membran potansiyelinin ölçülebilmesi için Elabscience (Texas, Amerika) mitokondriyal membran potansiyeli tespit kiti (JC-1) kullanılmıştır. Deney yapılırken işlem basamakları kitin kullanım kılavuzunda belirtildiği gibi takip edilmiştir. Hücreler 6 kuyucuklu plakaya 7×10^5 hücre yoğunluğunda ekilerek 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler PBS ile yıkanarak farklı konsantrasyonlarda elajik asit (10-25-50 µM) ve 5 mM glukozamin ile 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kullanılacak reaktif hazırlığında her 20 µL JC-1, 9 mL ultra saf su ile seyreltilmiştir. Ardından 1 mL JC-1 deney tamponu eklenerek tekrar çözelti hazırlanmıştır. Karbonil

siyanür m-klorofenilhidrazon (CCCP)' den 10 mM, besiyeri ile 1000 kat seyreltilerek, oluşturulan çözelti hücreler 20 dakika inkübe edilmiştir. Süre tamamlandığında 300×g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından hücreler 500 µL JC-1 solüsyonuyla tekrar süspanse edilip, hücreler 20 dakika daha 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, tekrar 300×g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilip, önceden soğutulmuş 1×JC-1 Deney Tamponuyla bir kez yıkanmıştır. Ardından hücreleri 1×JC-1 deney tamponuyla süspanse edilmiş ve akış sitometrisi ile ölçülmüştür.

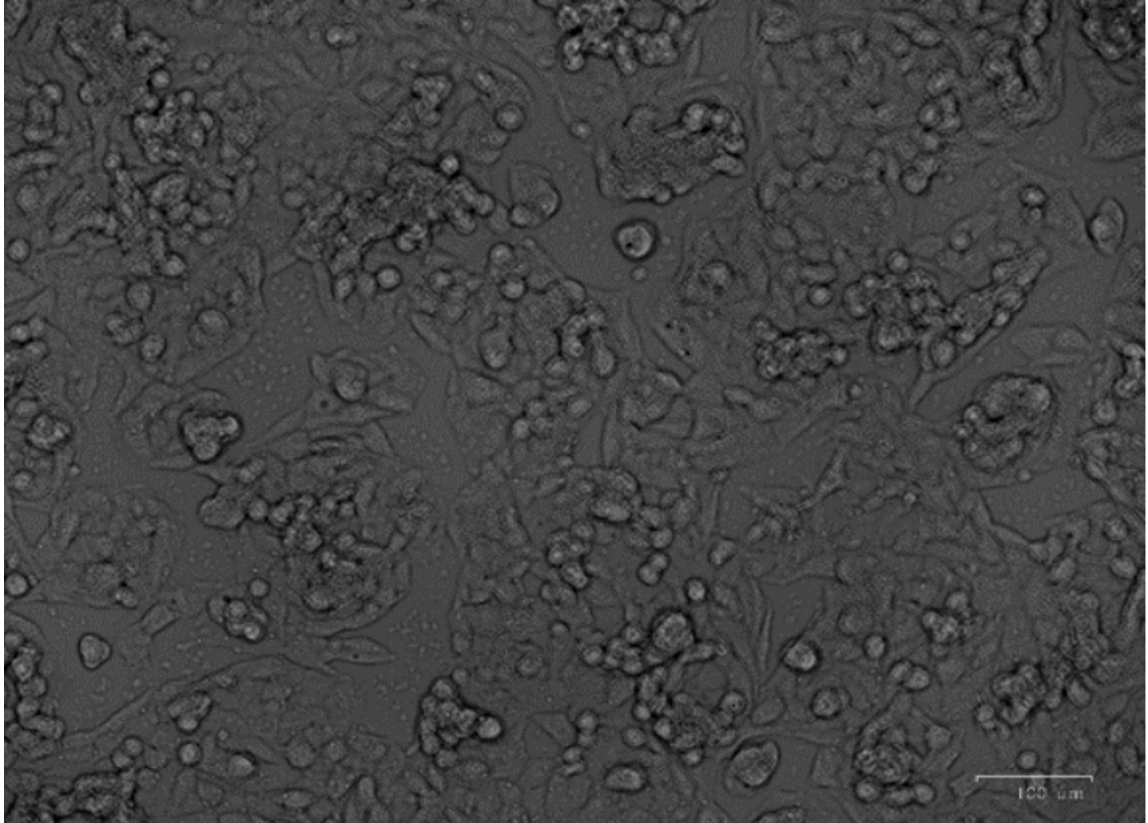
3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar, üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir ve gruplar arasındaki farklar GraphPad Prism 10.0 yazılımı ile Tek yönlü ANOVA kullanılarak karşılaştırılmıştır ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı bir fark olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. HEPG2 HÜCRELERİNİN GÖRÜNTÜSÜ

HepG2 hücreleri %90 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin, %10 ısı ile inaktive edilmiş FBS ile 37°C'de %95 nemlendirilmiş bir ortamda ve %5 CO₂ atmosferde, T25 flasklarda inkübe edilerek büyütülmüştür. Ardından her 2-3 günde bir pasajlanarak taze ortam ile değiştirilmiştir. HepG2 hücrelerinin görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.

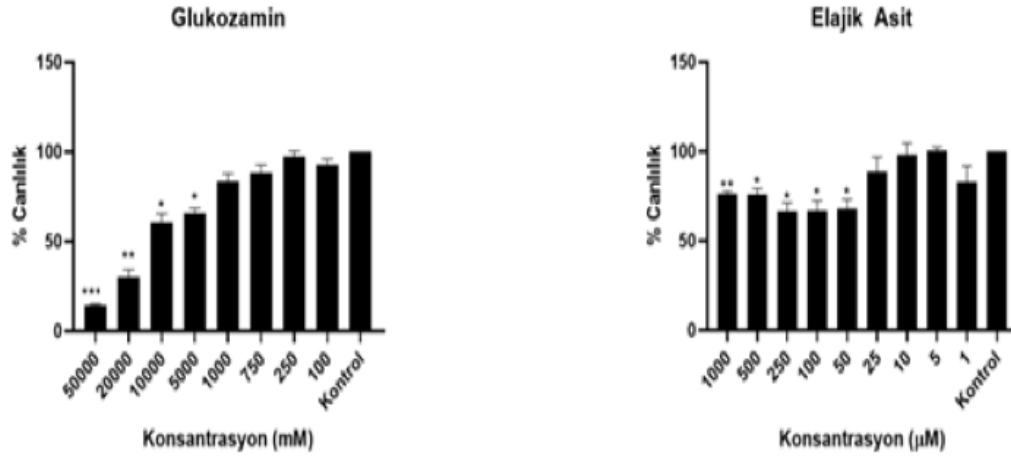


Şekil 4.1: HepG2 hücrelerinin görüntüsü

4.2. HÜCRELERDE CANLILIK DEĞERLERİ

DMSO içinde çözündürülüp 25 mM düzeyinde hazırlanan elajik asidin HepG2 hücrelerinin canlılık düzeylerine etkisini incelemek için 0-1000 µM aralığında uygulanmıştır. Glikozaminin etkisini görebilmek için ise 0-50000 µM aralığında

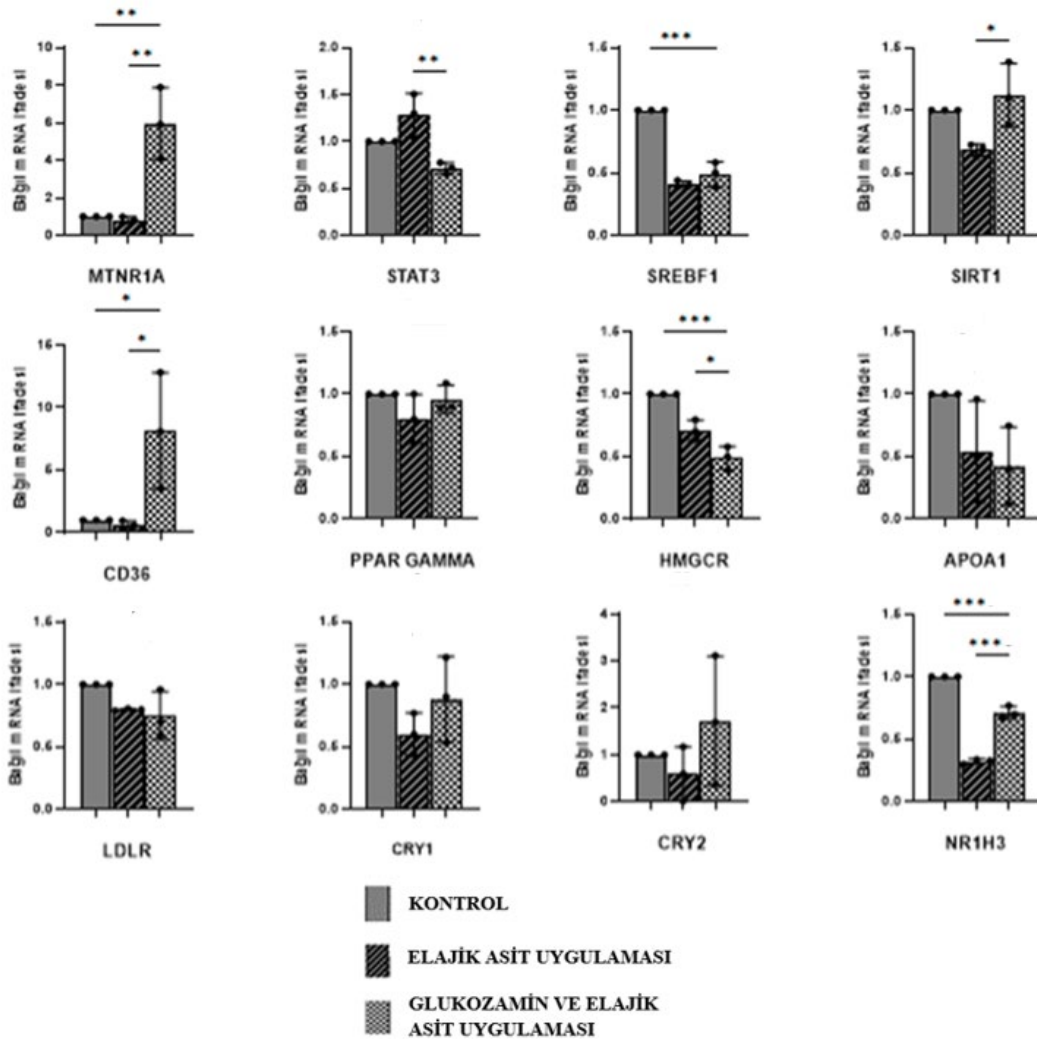
uygulama yapılmıştır. Sitotoksisite analizinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.2’de sunulmuştur. MTT testi sonucunda elajik asit için belirlenen IC₅₀ değeri 25 µM ve glikozaminin IC₅₀ değeri 5000 µM olarak belirlenmiş ve analizlerde bu konsantrasyonlar uygulanmıştır.



Şekil 4.2: Farklı konsantrasyonlardaki elajik asit ve glukozamin uygulaması sonucunda elde edilen canlılık değerleri (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,005$, ***: $p < 0,0005$)

4.3. ELAJİK ASİDİN SİRKADİYEN RİTM İLE İLİŞKİLİ GENLERİN ANLATIMLARI ÜZERİNE ETKİSİ

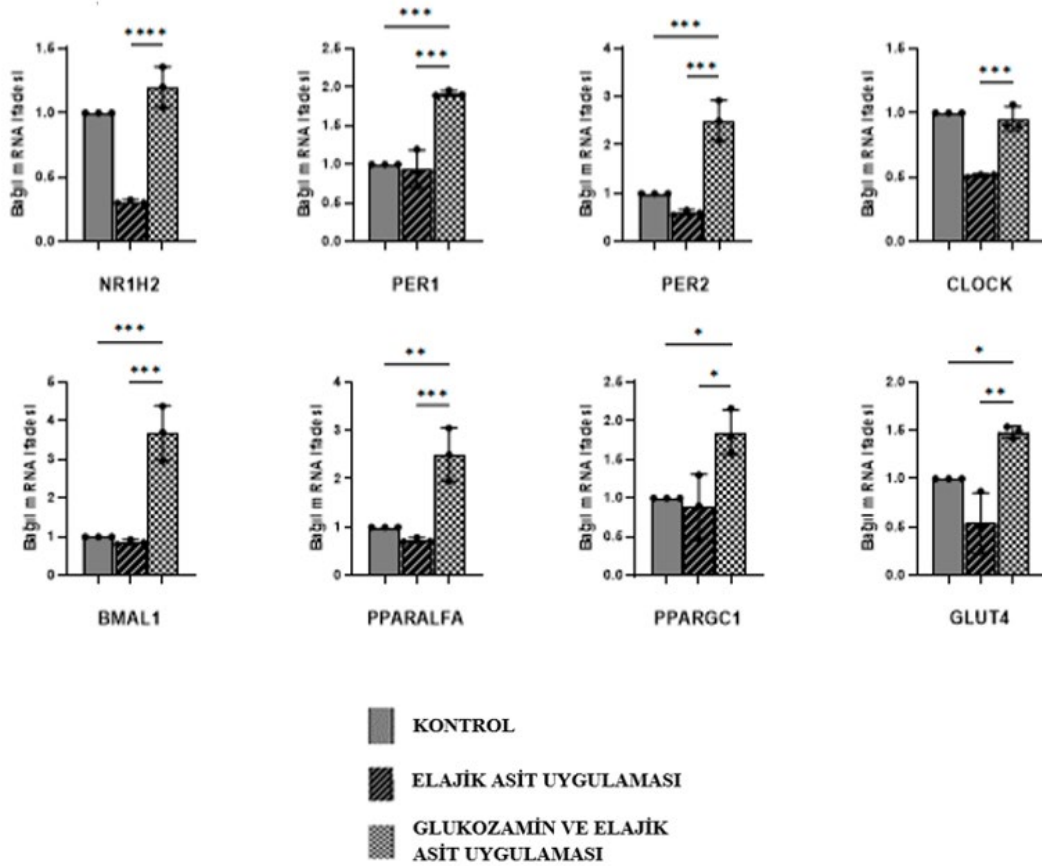
HepG2 hücre hattına IC₅₀ dozunda uygulanan punikalajinin sirkadiyen ritim mekanizmasında etkili genlerin anlatımları üzerine etkisi incelenmiştir. CD36, PPAR- γ , HMGCR, APOA1, LDLR, CRY1, CRY2, NR1H3, NR1H2, MTNR1A, STAT3, SREBF1, SIRT1, PER1, PER2, CLOCK, BMAL1, PPAR- α , PPARGC1A, GLUT4 genlerinin anlatımlarında değişimler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre hesaplanmış ve Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’ te gösterilmiştir. GAPDH ve bata aktin kontrol gen olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.3: CD36, PPAR- γ , HMGCR, APOA1, LDLR, CRY1, CRY2, NR1H3, genlerinin anlatımlarında değişimler. *: $p<0,05$, **: $p<0,005$, ***: $p<0,0005$

MTNR1A gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,005$). EA uygulamasında ise glukozamin ve EA uygulamasına kıyasla anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p<0,005$). STAT3 gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Ancak EA uygulamasında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,005$). SREBF1 gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir azalış göstermiştir ($p<0,0001$). Elajik asit uygulaması ise glukozamin uygulamasına kıyasla anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. SIRT1 gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir değişim göstermemiştir. Ancak EA uygulaması glukozamin ve EA uygulamasına kıyasla anlamlı

bir azalma göstermiştir ($p<0,05$). CD36 gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). EA uygulaması ise glukozamin ve EA uygulamasına kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,05$). PPAR- γ , APOA1, LDLR, CRY1 ve CRY2 gen ekspresyonlarında, glukozamin ve EA uygulamasında ve sadece EA uygulamalarında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. HMGCR gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir azalış göstermiştir ($p<0,0005$). EA uygulaması ise glukozamin ve EA uygulamasına kıyasla anlamlı bir azalış göstermiştir ($p<0,05$). NR1H3 gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında ve glukozamin ve EA uygulamasına kıyasla elajik asit uygulaması da anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,0005$).



Şekil 4.4: NR1H2, MTNR1A, STAT3, SREBF1, SIRT1, PER1, PER2, CLOCK, BMAL1, PPAR- α , PPARGC1A, GLUT4 genlerinin anlatımlarında değişimler. *: $p<0,05$, **: $p<0,005$, ***: $p<0,0005$

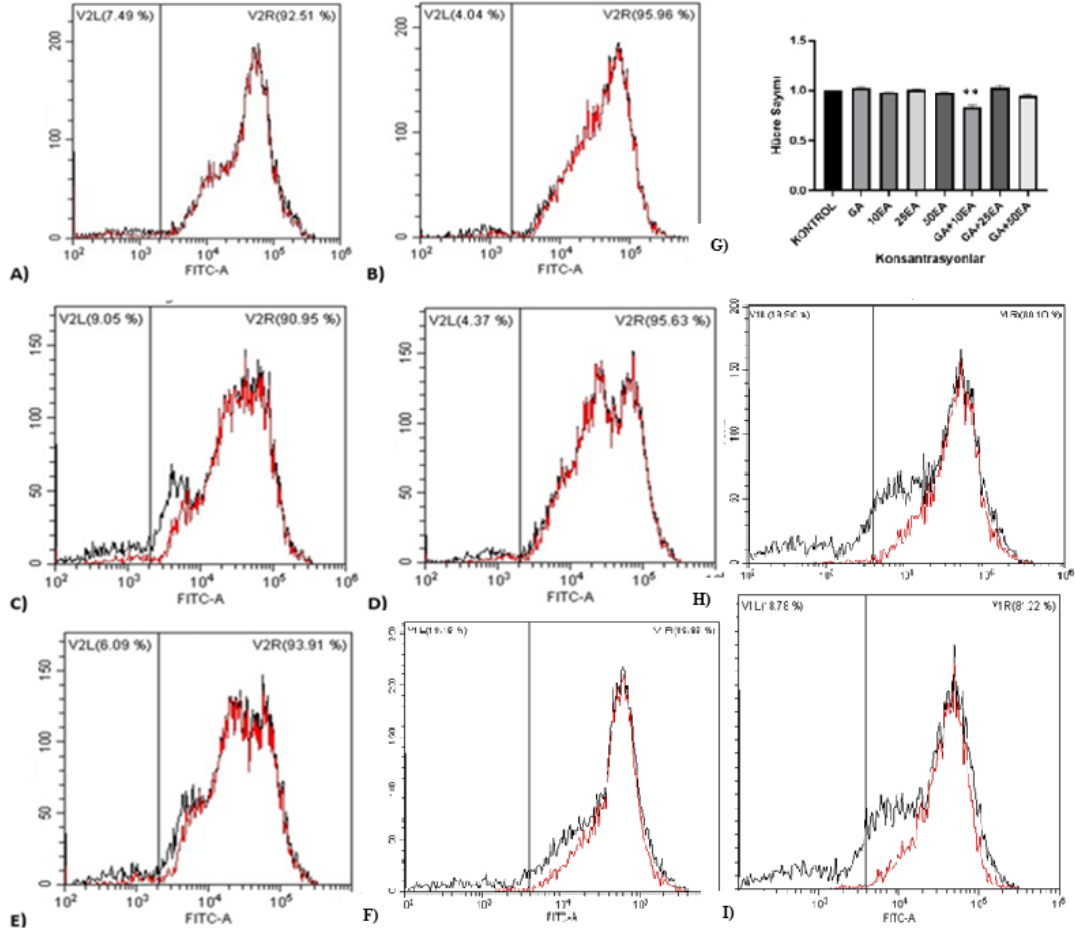
NR1H2 gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı değişim gözlenmemiştir. Ancak EA uygulaması glukozamin ve EA uygulamasına kıyasla anlamlı bir azalış göstermiştir ($p<0,0001$). PER1 ve PER2 gen ekspresyonlarında, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,0001$). EA uygulaması ise glukozamin ve EA uygulamasına kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,0001$). CLOCK gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ancak EA uygulaması, glukozamin ve EA uygulamasına kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,05$). BMAL1 gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,0005$). EA uygulamasında ise glukozamin ve EA grubuna kıyasla anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($p<0,0005$). PPAR- α gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,005$). EA uygulamasında ise glukozamin ve EA grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,0005$). PPARGC1 gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir artış gözlenmiş, EA uygulamasında ise glukozamin ve EA grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). GLUT4 gen ekspresyonunda, kontrole kıyasla glukozamin ve EA uygulamasında anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p<0,05$). EA uygulaması ise glukozamin ve EA uygulamasına göre anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,005$).

4.4. ELAJİK ASİDİN MİTOKONDİRİ MEMBRAN POTANSİYELİ ÜZERİNE ETKİSİ

Mitokondriyal membran potansiyeli üzerinde elajik asit ve glukozamin uygulamalarının etkisi değerlendirilmiştir. DMSO kontrol grubu referans olarak kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.4'te sunulmuştur. Mitokondriyal membran potansiyelinde elajik asit ve glukozamin uygulamalarının etkilerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen analizlerde, kontrol grubu (DMSO) ile deney grupları arasında yüzde mitokondriyal membran potansiyel değişim değerleri karşılaştırılmış Şekil 4.5'te sunulmuştur.

EA ve glukozamin uygulamalarının HepG2 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli üzerindeki etkileri incelenmiş ve elde edilen histogramlar kontrol grubu DMSO ile karşılaştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki uygulamalara rağmen,

glukozamin ve 10 μ M EA uygulamasındaki belirgin düşüş dışında gruplar arasında mitokondriyal membran potansiyelinde bir fark gözlenmemiştir.

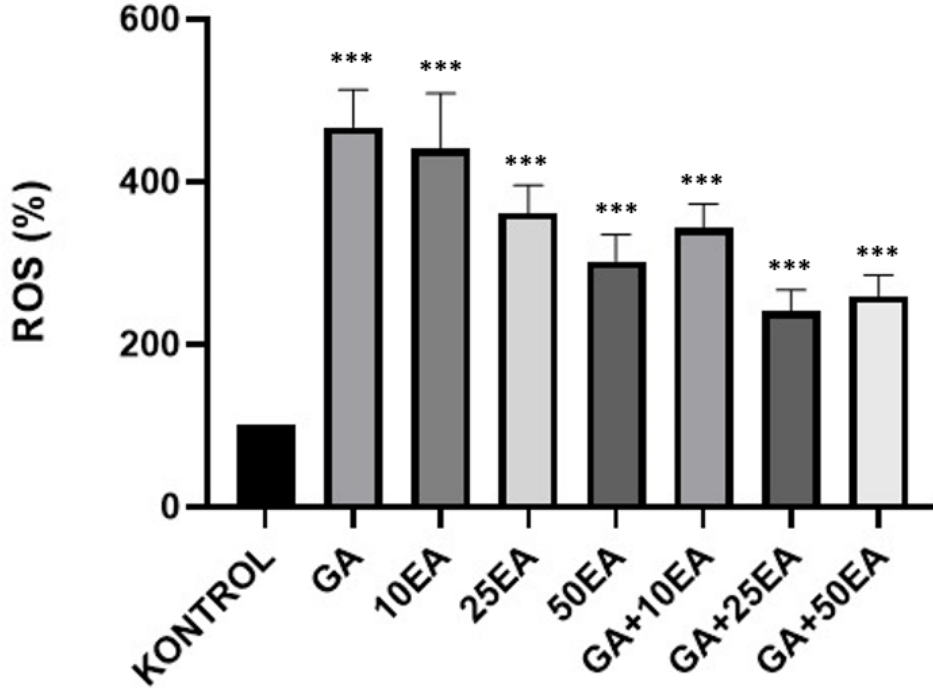


Şekil 4.5: Elajik asit ve glukozamin uygulamalarında mitokondri membran potansiyeli değişiklikleri ve istatistiksel değerlendirme (**: $p<0,005$) A) Kontrol uygulaması B) Glukozamin uygulaması C) 10 μ M Elajik asit ile glukozamin uygulaması D) 25 μ M Elajik asit ile glukozamin uygulaması E) 50 μ M Elajik asit ile glukozamin uygulaması F) 10 μ M Elajik asit uygulaması H) 25 μ M Elajik asit uygulaması I) 50 μ M Elajik asit uygulaması G) İstatistiksel değerlendirme

ANOVA testi sonuçlarına göre, GA + 10 EA uygulaması (**: $p<0,005$) dışındaki tüm metrikler için p-değerleri 0,05'in üzerinde bulunmuştur.

4.5. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ DENEYİ

Oksidatif stress belirlemesi, DCFH-DA floresan probu kullanılarak ROS florometrik analiz kiti ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.6’da sunulmuştur.



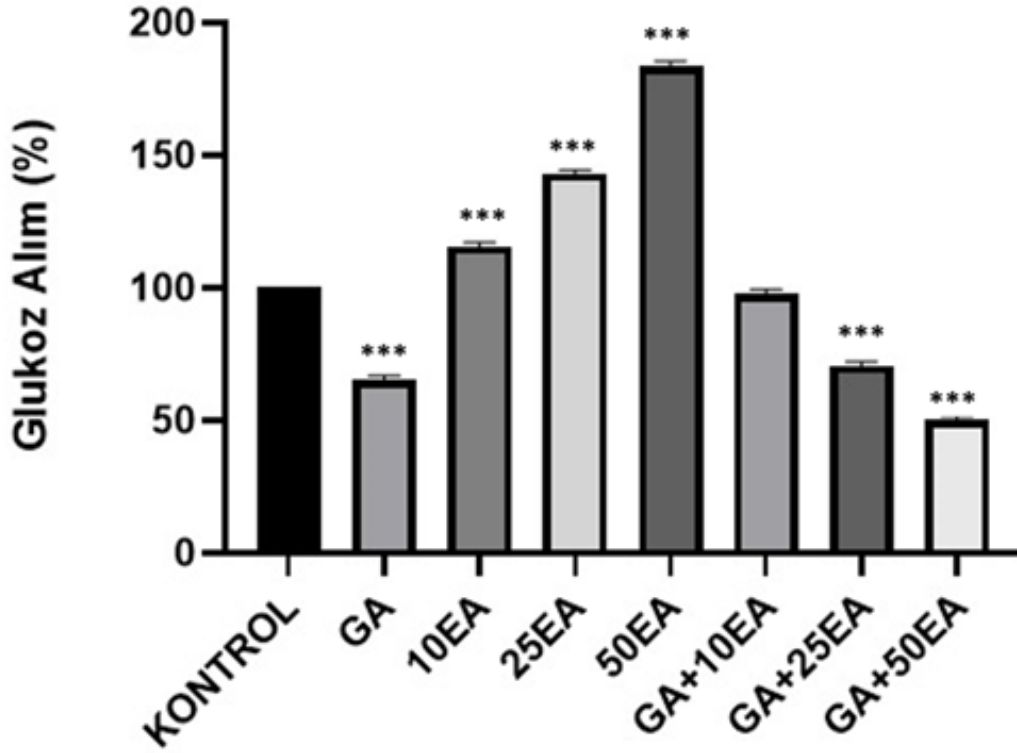
Şekil 4.6: Elajik asit ve glukozamin uygulamalarında reaktif oksijen türleri değerleri

Elde edilen veriler, GA’nın hücrelerde reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerinde belirgin bir artışa neden olduğunu göstermiştir ($p < 0.0005$). EA’nın farklı konsantrasyonlardaki uygulamaları, GA’nın oluşturduğu oksidatif stresi doza bağlı olarak baskılamıştır. ($p < 0.0005$). Glukozamin uygulamasının ardından EA uygulandığında her konstrasyonda anlamlı azalış görülmesine rağmen, 50 μ M EA+GA uygulamasında kontrole göre anlamlı ($p < 0.0005$) ancak 25 μ M EA+GA uygulamasında istatistiksel olarak anlamsız bir artış gözlemlenmiştir ($p > 0.05$).

4.6. GLİKOZ ALIM DENEYİ

HepG2 hücrelerinde EA uygulamasının glikoz alımı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Hücreler insülin direnci modelinde 5000 μ M glukozamin ile

muamele edilerek hazırlandıktan sonra farklı konsantrasyonlarda elajik asit (10, 25 ve 50 μ M) uygulanmış ve glikoz alım düzeyleri belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.7’ de sunulmuştur.



Şekil 4.7: Elajik asit ve glukozamin uygulamalarında glikoz alım değerleri

Elde edilen elajik asitin glikoz alımını doz bağımlı olarak artırdığını göstermektedir. 10 μ M EA uygulaması, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış sağlarken ($p < 0.0005$), 25 μ M ve 50 μ M elajik asit uygulamalarında bu artışın daha belirgin olduğu görülmüştür ($p < 0.0005$). En yüksek glikoz alım oranı 50 μ M elajik asit uygulanan hücrelerde gözlenmiştir. Bununla birlikte, glukozamin ile indüklenen insülin dirençli hücrelerde 10 μ M EA ile kombine uygulama (GA+10EA) glikoz alımında anlamlı bir değişiklik oluşturmazken ($p > 0.05$), 25 μ M ve 50 μ M EA kombinasyonları (GA+25EA, GA+50EA) glikoz alımında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur ($p < 0.0005$).



5. TARTIŞMA

Metabolik bozukluk koşullarında sirkadiyen saat osilatörlerinin modülasyonunu ayrıntılı incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda farklı polifenollerin onarıcı etkileri ortaya koyulmuştur. Araştırmamızda glukozamin uygulaması ardından ekspresyonu bozulan BMAL1, CLOK genlerinin EA uygulamasıyla stimüle edilebildiği görülmüştür. Literatür incelemesi yapıldığında, ratos nukleus pulpozus hücrelerinde (NPC'ler) 20 µM glukozamin uygulaması ardından EGCG ile yapılan bir çalışmada BMAL1 ve CLOCK ekspresyonu azalmış ve uygulamanın ardından anlamlı derecede artmıştır (134). Bununla birlikte *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerinin birlikte kullanıldığı bir çalışmada 10 µM H₂O₂ uygulaması ardından 20 µM EGCG HepG2 hücrelerine ve birincil fare hepatositlerine sirkadiyen genlerin hafif osilasyonlarını geri kazandırmış ve aynı zamanda BMAL1 protein seviyelerinde artış gözlenmiştir (135). Aynı konsantrasyondaki (40 µg/mL) çay polifenollerini ile ön uygulama yapılan iki farklı çalışmada HepG2 ve insan nöroblastoma SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. İki çalışmanın da sonuçlarına göre CLOCK, BMAL1, PER1/2, CRY1/2 ve SIRT1 proteinlerinin bozulan regülasyonlarının geri kazanıldığı gösterilmiştir (136,137). Benzer şekilde, 200 µM konsantrasyonundaki kikorik asit ile yapılan uygulama, HepG2 hücrelerinde tüm saat genlerinin transkript seviyelerinin hafif osilasyonlarını iyileştirmiştir (138). Diğer bir güçlü polifenol olan kapsaisin ile yapılan çalışmalarda HepG2 hücrelerinde, 50 µM konsantrasyonunda yapılan kombineli uygulamanın, CLOCK, BMAL1, PER1/2, CRY1/2 ve Rev-Erba gen ve protein düzeylerindeki dengesiz değişimleri azalttığı bildirilmiştir (139,140). Resveratrol ile yapılan çalışmada ise HepG2 hücre hattında 100 µM konsantrasyonunda yapılan ön uygulamanın bozulan BMAL1, CLOCK ve SIRT1 ifadesini düzenlediği bildirilmiştir (141). Fare hepatosit AML-12 hücrelerinde ise bir stresör kullanılmadan 50 µM resveratrol uygulanmasının BMAL1, SIRT1, PGC1A, SREBP1C gen ifadelerinin ekspresyonlarını düzenlediği bildirilmiştir (142). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde araştırmamızda glukozamin etkisi ile BMAL1 ve CLOCK gen ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir. Benzer bir şekilde Li ve ark. (2013) BMAL1 ve CLOCK proteinlerinin ritmik olarak O-GlcNAcilendiğini ve bu sinyalin BMAL1 ve CLOCK proteinlerinin ubiquitinasyonunu inhibe ederek stabilizasyon sağladığını ve saat hedef genlerinin aktivasyonunu desteklediğini bildirmiştir (143). Ma ve ark. (2013) ise, O-GlcNAcilasyonun NIH3T3 fibroblastlarında BMAL1 transkripsiyonel aktivitesini

artırdığını göstermiştir (144). U2OS hücrelerinde glukozaminin dolaylı sirkadiyen gen etkileşimlerini araştıran bir çalışma, CLOCK, BMAL1, PER1/2, CRY1/2 proteinlerinin stabilitesini ve transkripsiyonel aktivitesini O-GlcNAcilasyon yoluyla artırabileceğini vurgulamaktadır (145). Ancak literatürdeki farklı çalışmaların sonuçları incelendiğinde, O-GlcNAcilasyon seviyesini artıran beş heksozamin biyosentez yolu (HBP) metabolitinden yalnızca glukozaminin sirkadiyen faz kaymasına neden olduğu gösterilmiştir (146). Ayrıca, glukozamin farelerde jet lag modelinde 8 saatlik faz gecikmesine adaptasyon süresini önemli ölçüde kısaltmıştır. Bu bulgular, O-GlcNAcilasyonun her zaman sirkadiyen faz değişikliklerine yol açmayabileceğini ve glukozaminin O-GlcNAcilasyondan bağımsız olarak sirkadiyen faz gecikmesine neden olabileceğini öne sürmektedir. Ek olarak, glukozaminin hem U2OS hücrelerinde hem de fare dokularında AMPK/mTOR sinyal yolunu değiştirdiği, ancak p-AMPK ve p-mTOR seviyelerinin değişmediği gösterilmiştir. Bu durum, glukozaminin O-GlcNAcilasyon yolundan ziyade AMPK/mTOR yolu üzerinden sirkadiyen faz gecikmesine neden olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, glukozaminin hücrel enerji dengesini ve NAD⁺ seviyelerini etkileyerek SIRT1 aktivasyonunu artırabileceği belirtilmektedir (145). Bu bulgular, glukozaminin sirkadiyen ritim üzerindeki etkilerinin birden fazla mekanizmayla ilişkili olabileceğini ve O-GlcNAcilasyonun bu süreçte tek belirleyici olmadığını düşündürmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalar arasında glukozaminin farklı etkileri görülmüş olabilir. Çalışmamızda artan EA ve glikozaminin beraber kullanım etkisiyle BMAL1 ve CLOCK aşırı ekspresyonunun ise HEPG2 hücrelerinde anti-apoptotik etkisi olduğu gösterilmiştir. EA artan BMAL1 ve CLOCK gen ifadelerini düzenleyici bir etki göstermiştir. Bu durum açıklanan mekanizmalar ışığında elajik asitin birden fazla mekanizma ile sirkadiyen gen ifadelerine etki edebileceğini düşündürmektedir.

BMAL1 ve CLOCK aktivitesi dışında çalışmamızdaki tüm sirkadiyen genler incelendiğinde PER1,2, CRY1,2 ve SIRT1 ekspresyonlarının glukozamin etkisiyle farklı derecelerde anlatımlarının arttığı görülmüştür. Ancak PER1 ve PER2 genlerinin artmış ekspresyonuna karşın CRY1, CRY2 ve SIRT1 genlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir. Fare fibroblast hücrelerinde nobiletinin (5 mM), CLOCK, BMAL1, PER2, CRY1/2 seviyelerini değiştirdiği ve PER2 proteinini artırdığı bulunmuştur (147). Fakat daha yüksek dozlarda (10 ve 20 μ M) nobiletin konsantrasyonları 3T3-L1 preadiposit hücrelerinde BMAL1 ve CRY1 gen ekspresyonunun doza bağlı olarak artırmıştır (148). Sudachitin (10 mM) ile yapılan bir

çalışmada insan U-2 OS, BMAL1, PER2 ve CRY1'in gen ve protein seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (149). Çalışmamızda CRY proteinlerinin herhangi bir müdahale ile artmayışının AMPK yolağına bağlı olduğu düşünülmüştür. CRY, AMPK yolağına bağımlıdır (150). Yukarıda belirtildiği gibi p-AMPK seviyesinin glukozaminle değişmeyişinin bir sonucu olarak CRY1 ve CRY2'de anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Mekanizmada bir bozukluk gözlemlenmediği için EA uygulamasının anlamlı sonuç vermemesinin olası olduğu düşünülmüştür. PER1 ve PER2 ile ilgili yapılan araştırmalar incelendiğinde, farklı resveratrol konsantrasyonlarının (10 veya 100 μ M) NIH3T3 hücrelerinde uygulanmasının etkileri gözlemlenmiştir. Yüksek konsantrasyonların, hem bazal koşullarda hem de CLOCK/BMAL1 ile indüklenen koşullarda PER1 bağıl lüsiferaz aktivitesini önemli ölçüde düşürdüğü rapor edilmiştir (151). LPS ile indüklenen sirkadiyen bozulmaya karşı yedi farklı turuncgil flavonoidi incelenmiş ve PER2 ekspresyonunun nobiletin ve tangeretin ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (152). Benzer şekilde, tangeretin (3 μ M) fibroblast hücrelerinde PER2'nin ritmik aktivitesini artırmıştır; ancak analog bileşikler olan naringin ve naringenin, PER2'nin sirkadiyen ritmi üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir (153). Nobiletin ile yapılan bir başka çalışma (5 ve 50 μ M), U-2 OS ve insan meme adenokarsinoma MCF7 hücrelerinde PER2 için tutarlı ritmik desenler ortaya koymuştur (147). Daha yüksek konsantrasyonlar ise insan meme adenokarsinoma MDA-MB-231 hücrelerinde PER2 ritmikliğini belirgin bir şekilde iyileştirmiştir (154). Ayrıca, sıçan C6 glioma kanser hücrelerinde 5 μ M kurkumin uygulamasıyla PER2'de ritmik bir desen indüklendiği gözlemlenmiştir (155). Çalışmamızda PER1 ve PER2' nin ekspresyonlarının glukozamin ve EA uygulaması ile artıp EA uygulaması sonrasında azalmış olması EA'nın düzenleyici etkisine atfedilmiştir. Glukozamin, metabolik stres yaratarak PER1 ve PER2 ekspresyonunu artırırken, EA bu metabolik stresi azaltarak veya hücrel redoks durumunu düzenleyerek bu genlerin ekspresyon seviyelerini baskılamış ve metabolik düzenleyici bir etki göstermiştir. Birlikte çalışan sirkadiyen genler incelendiğinde ise EA, CLOCK/BMAL1 kompleksinin transkripsiyonel aktivitesini doğrudan veya dolaylı yollarla azaltarak PER1 ve PER2'nin ekspresyon seviyelerini düşürmüş olabileceği düşünülmüştür. Ancak PER1 ve PER2 farklı fizyolojik şartlarda değişen seviyeler göstermiştir. Belirtilen çalışmalarda çeşitli hücre senkronizasyon tekniklerinin kullanılması, elde edilen sonuçların fizyolojik anlamlılık potansiyelini artırmaktadır.

Fakat farklı fizyolojik koşullarda daha net bir mekanizmanın anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

SIRT1, BMAL1 ve CLOCK transkripsiyonunu aktive ederek sirkadiyen ritimleri kontrol eden önemli bir düzenleyicidir. SIRT1, deasetilasyon yoluyla PGC-1 α aktivitesini de doğrudan etkileyebilir. Çalışmamızda EA ve glukozamin uygulaması SIRT1 ekspresyonunda ılımlı bir artış göstermiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır, EA uygulaması sonrasında ise düşüş gözlenmiştir. PGC-1 α ekspresyonunda EA ve glukozamin uygulaması ile anlamlı bir artış gözlenirken sadece EA ile düşüş görülmüştür. Yapılan bir çalışmada akrilamid ile indüklenen HepG2 hücrelerinde resveratrolün (50 μ M) SIRT1 ve PGC-1 α protein seviyelerinde artışa yol açtığı bildirilmiştir (156). Bununla birlikte insan böbrek HK-2 hücreleri üzerinde resveratrol (50 μ M) ile yapılan bir çalışma, SIRT1/PGC-1 α sinyalleşmesinin resveratrol aracılı olarak anlatımının artması yoluyla BMAL1 baskılanmasının neden olduğu bozulmaları iyileştirdiğini göstermiştir (157). Diğer yandan HEPG2 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda uygulanan resveratrolün (0-100 μ M) sirkadiyen genlerin ifadelerinin susturulduğu ortamda SIRT1 ve PGC-1 α gen anlatımlarını düşürebildiği gözlemlenmiştir (158). Ek olarak çay polifenollerinin de SIRT1 proteininin zayıflamış sirkadiyen salınımını yeniden düzenlediği rapor edilmiştir (137). Bu çalışmalarda SIRT1 ve PGC-1 α 'nın olumlu etkilerinin BMAL1'e bağımlı olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde EA ve glukozamin uygulaması ile BMAL1'deki artışın EA aracılığıyla azaldığı görülmüştür. Aynı zamanda SIRT1 ve PGC-1 α protein ekspresyonlarının EA ile azalması metabolik geri bildirim yollarının oluşumu olarak düşünülmüştür. Bozulan sirkadiyen ritim dinamikleri bu genler aracılığı ile EA tarafından düzenlenmektedir. Bu açıdan EA, SIRT1 protein düzeylerinin azaltılması yoluyla HepG2 hücrelerinde BMAL1 ve PGC-1 α protein ekspresyonlarını düzenleyerek sirkadiyen saatler üzerinde koruyucu bir etki gösterdiği düşünülmektedir.

MTNR1A melatoninin etkilerini düzenleyen iki genden birisidir. Beyin, iskelet kasları, yağ dokusu ve pankreas adacıkları gibi çeşitli merkezi ve periferik dokularda ifade edilir ve insülin salgılanmasında rol oynar, baskın olarak pankreas alfa hücrelerinde ifade edilmektedir (159). Çalışmamızda MTNR1A anlatımı EA ve glukozamin etkisiyle artmış ancak EA etkisiyle kontrol seviyesine gerilemiştir. Yapılan bir çalışmada MTNR1A'nın BMAL1 ve CLOCK dahil olmak üzere kondrifikasyon merkezindeki saat

genlerinin anlatımlarını düzenlediğini ve melatoninin sirkadiyen ritmini geri kazandırdığını göstermiştir. Özellikle BMAL1 yolağında p-AMPK değerini artırarak CRY1'i dengesizleştirip BMAL1 ekspresyonunu artırarak sıçanlarda endokondral kemik oluşumunu artırdığını göstermiştir (160). Yani bu yolak üzerinden MTNR1A ve BMAL1'in glukozaminle yükselen değerleri uyumludur. Ancak kanser hücre hattında yapılan başka bir çalışmada ise; MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde MTNR1A artışının WEE-1 yolağındaki genlerin anlatımlarını PER1 ve PER2 genleri aracılığı ile artırdığını ortaya koymuştur (161). Ancak WEE-1 yolağının susturulması kanser hücre hatları üzerinde teropatik bir tedavi yöntemi olarak araştırılmaktadır (162). Bu nedenle çalışmamızda EA'nın HEPG2 hücre hattında MTNR1A geninin aşırı ekspresyonunu azaltmasının BMAL1 aracılığıyla ve PER1 düzenlenmesi yoluyla iki farklı mekanizma üzerinden kanser hücre hatları için de ümit vaddebilecek teropatik bir ajan olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda STAT3 gen anlatım düzeylerinin EA ve glukozaminle değişmediği ancak sadece EA uygulamasının ardından kontrole göre arttığı görülmüştür. STAT3'ün Bcl-2, Bcl-xL, siklin D1, c-Myc ve survivin gibi alt akış hedef genlerinin düzenlenmesi yoluyla hücrel çoğalmayı, farklılaşmayı, hücre döngüsü ilerlemesini, metastazı, anjiyogenezi ve iMünosüpresyonu mekanizmalarında önemli bir görev aldığı bilinmektedir. Uyarılmamış hücrelerde, STAT3 inaktiftir ve sitoplazmada monomer olarak bulunur. Çeşitli uyarılarla aktive edildikten sonra, fosforile edilmiş STAT3 (p-STAT3), hedef genlerin promotör dizisine bağlanarak transkripsiyonu başlatmak için çekirdeğe taşınır. Bu nedenle, STAT3, fosforile edilmiş STAT3 dimerlerinin oluşumu ve sitokin bağımlı transkripsiyonda fosforile edilmemiş STAT3'ün artan miktarları yoluyla işlevler uygulayabilir (163). Özellikle kanser hücrelerinde p-STAT3 önemli bir araştırma konusudur. Polifenoller de bu konuda üzerine sıklıkla çalışılan ajanlar olmuşlardır (164). İnsan servikal kanser hücrelerinde farklı dozlarda elajik asit (0, 10, 20 ve 30 μ M) ile yapılan bir çalışmada p-STAT3'ün doza bağımlı olarak azaldığı gösterilmiştir (165). Özofageal skuamöz hücreli karsinom hücre hattında IL-6 ile indüklenen EA (0, 10, 20 ve 40 μ M) uygulamasının STAT3 mRNA anlatımında ılımlı bir artış gösterirken p-STAT3 aktivitesini doza bağımlı olarak azaltmıştır (166). İnsan PC3 hücre hattında EA ile (0-100 μ M) yapılan bir çalışma da benzer sonuçları vermiştir (167).

Alkole bağı olmayan karaciğer hastaları ile yapılan çalışmalarda CD36 tedavi için potansiyel bir hedef olarak önerilmektedir. Steatotik karaciğerlerin, sağlıklı karaciğerlere kıyasla artmış CD36 anlatımına sahip olduğu gösterilmiştir (168). Çalışmamızda EA ve glukozamin ile anlamlı derecede yükselen CD36 gen anlatımı sadece EA uygulaması ile kontrol seviyesine gerilemiştir. Son yıllarda, kurkuminin NAFLD'li fare modellerinde lipid metabolizmasını etkilediği gösterilmiştir. Yapılan bir fare çalışması kurkuminin yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu diyetle beslenen farelerde karaciğerdeki CD36 mRNA seviyesini önemli ölçüde azalttığı ve yağ asidi alımını azalttığını bulmuştur (169). Sinamik asidin (12.5, 25, 50, 100, ve 200 μ M) ise HEPG2 hücrelerinde lipid damlacıklarının birikimini azalttığını, sinamik asit uygulamasından sonra obez sıçanlarda CD36'nın mRNA ifadesinin önemli ölçüde anlatımının azaldığı ve hepatositlerdeki yağ asidi alımının engellendiğini bulmuştur (170). Kuersetin'in yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde gen ve protein düzeyinde CD36'yı baskıladığı böylece hepatik oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein (ox-LDL) aşırı birikimini azalttığını ve uzun vadeli yüksek yağlı diyet kaynaklı karaciğer hasarını hafiflettiğini bulmuştur (171). CD36'nın anlatımının azalması karaciğer lipid birikimi için olumlu görünmektedir. Ancak CD36 eksikliğin paradoksal olarak NAFLD gelişimini desteklediği belirtilmektedir (168). İnsanlarda, genetik CD36 eksikliği olan hastalar bilinmeyen mekanizmalarla yağlı karaciğer geliştirmeye eğilimlidir (172). Ob/ob farelerinde CD36 delesyonu, hepatik VLDL çıkışını baskılayarak karaciğer steatozunu kötüleştirmiştir (173). Benzer şekilde, CD36 gen ifadesi baskılanmış fareler düşük yağlı bir diyetle beslenseler bile hepatik insülin direnci ve lipid birikimi gösterdiğini (174) ve bir yüksek yağlı diyet ile beslendiklerinde ağırlaşmış hepatik inflamasyon, steatoz ve fibroz sergilediğini göstermiştir (175). Bu nedenle CD36'nın düşük ancak belirli bir seviyede tutulmasının karaciğer lipid mekanizması için en sağlıklı olduğu düşünülmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar EA'nın karaciğer lipid mekanizmasında CD36 aracılı olarak olumlu bir yönelim gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Çalışmamızda SREBP1 ifadesi hem EA ve glukozamin ile hem de EA ile azalmış azalma miktarları kıyaslandığında istatistiksel bir farklılık bulunamamıştır. PPAR- γ için EA grubunda bir düşüş görülmüş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. LXR'ların incelenmesinde ise EA grubunda hem NR1H2 hem de NR1H3 gruplarında anlamlı ve yüksek düşüşler gözlenmiştir. Karaciğer X reseptörlerinin (LXR'lar NR1H2 ve NR1H3) SREBP-1c aracılığı ile adipogenezi indüklediği düşünülmektedir (176).

Bununla birlikte PPAR- γ aracılığıyla doğrudan veya dolaylı olarak CD36'yı düzenleyerek steatozu teşvik edebileceği belirtilmiştir. Bu aktivasyonun karaciğere özgü olduğu belirtilmektedir (177). LXR aracılı, PPAR- γ 'nin aktivasyonunun da CD36 aktivasyonunu ve steatozu teşvik edebileceği düşünülmektedir. Araştırmalar; LXR ve PPAR- γ 'nin sinerjik olarak CD36 ekspresyonunu teşvik etmeye katkıda bulunduğunu ve bunun da hepatik steatozu teşvik ettiğini göstermiştir (169,177). Ek olarak, karaciğer hücrelerinin palmitik asit ile muamelesinin PPAR- γ ve hedef genlerinin anlatımlarının artırılması yoluyla CD36 ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) ekspresyonunu güçlü şekilde indüklediğini göstermişlerdir. Böylelikle karaciğer yağ depolamasını artırdığını ve bunun da hepatik steatoza yol açtığı belirtilmiştir (178). Literatür incelemesinde kahve polifenollerinin yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde SREBP-1c seviyesini azaltarak lipogenezi engellediği görülmüştür (179). Benzer şekilde gallik asit HEPG2 hücrelerinde SREBP-1c seviyesini azaltmıştır (180). Resveratrol uygulamasında (10, 25, 50, 75, 100 μ M) ise; SREBP-1c ve PPAR- γ gen anlatımında düşüş gözlenmiştir (181). Zencefil ekstraktı ile yapılan benzer bir yüksek yağlı diyetle beslenen fare çalışmasında ise SREBP-1c ve PPAR- γ gen anlatımında düşüş görülmüştür (182). Meyan kökü polifenollarıyla yapılan bir diğer çalışmada da LXR' ların aracılığıyla SREBP-1 kaynaklı lipid birikiminin HEPG2 hücre hattında engellendiği gösterilmiştir (183). Kurkumin nikotinat ile yapılan bir çalışma da LXR aracılı köpük oluşumunun azaldığı gösterilmiştir (184). EA'nın lipid aracılı koruyucu etkilerini LXR'lar aracılı yollar ile gösterdiği düşünülmektedir (169). Ancak lipid metabolik çalışmalarında farklı stresör ve ortamların farklı yanıtlar oluşturduğu belirtilmektedir. Fakat lipotoksik etkilerin ve değişen gen ifadelerinin ortak mekanizmaları değerlendirildiğinde sirkadiyen ritim aracılığı gözlenmektedir. mRNA düzeyinde BMAL1/CLOCK transkripsiyonunun azalmasının dolayısıyla sirkadiyen saat ile metabolik bozuklukların lipid metabolizmasındaki bozulmalara yol açabildiği bilinmektedir. Polifenollerin teropatik etkileri sadece lipid metabolizması üzerinden değil sirkadiyen ritimleri de düzenleyerek de çalışır (185). Çalışmamızda EA hem sirkadiyen gen ekspresyonlarını hem de lipid metabolizmasını düzenleyerek bütünleyici bir etki gösterdiği düşünülmektedir.

Yükselen APOA1 ekspresyonu plazma HDL seviyelerini artırmaktadır ve aterosklerozun azalmasına yol açan HDL işlevselliğini teşvik etmektedir (186). Çalışmamızda APOA1 ekspresyonlarında yapılan müdahalelerin istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği görülmektedir. Elma kabuğu özütleri ve prosiyanidin ile

HepG2 hücre hattında yapılan bir çalışmada ApoA1 hücre ekspresyonundaki artış arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur (187). Öte yandan üzüm çekirdeği polifenolleriyle HepG2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise 20 µg/ml'den daha yüksek konsantrasyonlarında endojen APOA1, yüksek glikoz konsantrasyonlarına 24 saat maruz kaldıktan sonra önemli ölçüde baskılanmıştır. Konsantrasyonu 10 µg/ml'den düşük olduğunda ise mRNA seviyesinde APOA1'in doza bağlı olarak gen anlatımını artabildiği gözlenmiştir (188). Konu ile ilgili yapılan bir insan çalışması incelendiğinde ise; NAFLD hastalarına günde 600 mg resveratrol ile uygulama yapılmış ve APOA1 seviyesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır (189). Bu açıdan sonuçlarımız insan fizyolojik mekanizmasına benzer sonuçlar vermiştir.

HMGCR inhibisyonu, hücre içi kolesterol biyosentezini azaltarak hücre LDL reseptörlerinin artışına yol açar. HMGCR inhibisyonu farmasotik olarak kolesterol tedavisinin hedefidir. Karaciğer, kolesterol biyosentezi, lipoprotein parçacıkları üretimi ve LDL parçacıkları katabolizmasının ana yeri olduğundan HMGCR inhibisyonu için ana hedef organdır. Ancak, ekstrahepatik dokulardaki kolesterol biyosentezi, hücrelerin normal yapısı ve işlevi için de önemlidir (190). Çalışmamızda HMGCR EA ve glukozamin uygulamasıyla azalmış, ardından sadece EA uygulamasıyla ılımlı ve anlamlı bir artış görülmüş ancak yine de başlangıç seviyesinin altında olduğu gözlenmiştir. Polifenollerin HMGCR üzerine olan etkileri incelendiğinde; karşılaştırmalı olarak düşük yağlı ve yüksek yağlı diyetle beslenen farelere 3,2 g EGCG/kg ile 17 haftalık müdahaleden sonra, yüksek yağlı diyet grubunda azalan HMGCR ekspresyonunun EGCG ile belirgin şekilde artırdığı görülmüştür (191). Silymarin takviyesiyle yapılan bir çalışmada, yüksek lipit seviyelerine sahip diyetle beslenen ot sazanlarında 0, 100 veya 200 mg/kg silymarin takviyesi sonucunda HMGCR mRNA gen anlatımının arttığı belirtilmiştir. Böylelikle endojen kolesterol sentezinin kapasitesinin iyileştiği düşünülmüştür (192). Bununla birlikte krosin (1 µmol/L), klorojenik asit (30 µmol/L), geniposid (10 µmol/L) ve kuersetin (10 µmol/L) kombineli bir uygulamada HEPG2 hücrelerinde HMGCR ekspresyonunu farklı oranlarda azalttıkları ancak kombine uygulamada en önemli düşüşü gördükleri bildirilmiştir (193). Fakat uzun süreli statin tedavisinde HMGCR inhibisyonunun miyopati veya rabdomiyoliz gibi yan etkileri görülmektedir. Bu nedenle serum kolesterolünü düşürmek için kullanılan ajanların uygun düzeyde düşüş göstermesi önemlidir (194). Elde ettiğimiz sonuç EA'nın HMGCR

yoluyla hepatik yollarda kolesterol düzenleyici olarak etkisinin görülebileceği düşünülmektedir.

Kolesterol mekanizmasının düzenlenmesinde diğer bir önemli etken ise LDLR'dir. Statinler, HMGCR üzerinden inhibe edici etki gösterir ancak aynı zamanda PCSK9 ekspresyonunu da artırdıkları bulunmuştur. Potansiyel PCSK9 inhibitörleriyle yapılacak tedavinin, LDLR aktivitesi üzerindeki etkilerini artırmak için statinlerle birleştirilebileceği düşünülmektedir. Dolaşımdaki LDL'nin büyük bir kısmı hepatik LDLR aracılı endositoz yoluyla kandan uzaklaştırılır (195). Çalışmamızın sonuçları değerlendirildiğinde; LDLR seviyesinde EA ve glukozamin veya sadece EA uygulamasının anlamlı bir fark göstermediği görülmüştür. Polifenollerin bu mekanizma üzerindeki etkileri incelendiğinde; HEPG2 hücrelerinde beyaz çay ekstresiyle (100, 200, 300 µg) yapılan bir çalışmada LDLR sentezinin arttığı gözlemlenmiştir (196). Naturel sızma zeytinyağı ile HEPG2 hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada ise (25, 50, 100, and 200 µg) doza bağımlı olarak HMGCR metabolizması üzerinden LDLR sentezini artırdığı gözlemlenmiştir (197). Diğer yandan kurmumin ile (10, 20 µg) yapılan çalışmada ise önceki çalışmalardan farklı olarak LDLR mRNA sentezi değişmezken LDLR aktivitesinin PCSK9 aracılığı ile arttığı gözlemlenmiştir (198). Bu farklılığın; hücrelerin lipoprotein içermeyen bir ortamda kültürlenmesinden dolayı LDLR mRNA seviyeleri kolesterol eksikliğine yanıt olarak maksimum düzeyde olduğu için görüldüğü düşünülmüştür. Bu nedenle polifenol ilavesinin, LDLR mRNA seviyelerini daha fazla artırma potansiyeline sahip olamayacağı ön görülmektedir. Çalışmamızda LDLR seviyelerinde anlamlı bir farklılık olmamasının nedeninin farklı stresörlere farklı yanıtlar verebilme yeteneğinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. EA'nın LDLR üzerindeki etkisinin net olarak anlaşılabilmesi için uygun bir kültür ortamı ile birlikte HMGCR ve PCSK9 ile beraber değerlendirmesinin potansiyel olarak etkin bir tedavi yöntemi oluşturmada ışık tutabileceği ön görülmüştür.

PPAR- α , öncelikli olarak karaciğer ve kahverengi yağ dokusunda ifade edilen bir metabolik düzenleyicidir. Enerji depolama, lipogenez, yağ asidi ekspresyonu, β -oksidasyon, ketogenez, glukoneogenez ve inflamasyon ile ilişkilendirilir (199). Çalışmamızda PPAR- α glukozamin ile bozulan hepatik süreçler neticesinde anlamlı olarak artmış, EA takviyesinin ardından büyük bir düşüş görülmüştür. Polifenollerin PPAR- α üzerindeki etkilerini gösteren çalışmalar farklı sonuçlar ve mekanizmalar

önermektedir. 3T3-L1 hücre hattında klorojenik asit (30 µg) ile yapılan bir çalışmada PPAR-α gen anlatımının anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir (200). NAFLD'lı farelere %3 naringenin takviyesi ile yürütülen bir çalışmada ise PPAR-α gen anlatımının düzeylerinde anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (201). Başka bir çalışmada ise yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde 30 mg/kg apigenin takviyesinin oksidatif stresi kullanarak Nrf2 yolağı üzerinden PPAR-α gen anlatımını azaltmıştır (202). Kuersetin ile yapılan bir çalışmada ise; hepatositlerde 5, 10 ve 20 mg/L kuersetin ilavesinin PPAR-α protein düzeyini 24. saatte önemli ölçüde arttığı, ancak mRNA düzeyini ise 24, 48 ve 72. saatlerde önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (203). Bu nedenle PPAR-α mRNA veya protein düzeyini etkilemeden aktivitesinin değişebileceği gösterilmiştir. Farklı polifenollerin farklı etkiler göstermesinin etki ettikleri genler ve metabolik yollar üzerinden olduğu düşünülmektedir.

Karaciğerde glikoz taşıyıcıları (GLUT'lar), glikozun emilimini ve taşınmasını etkileyen yaygın insülin sinyal yolu proteinleridir. Bunlar arasında GLUT4, iskelet kası ve karaciğerin önemli glikoz taşıyıcıları olarak çalışır ve hücrel glikoz homeostazının korunmasında temel bir rol oynar (204). Çalışmamızda EA ve glukozamin muamelesiyle artan GLUT4, sadece EA uygulaması sonrasında anlamlı derecede azalmıştır. Literatürde polifenollerin etkisi incelendiğinde ise C2C12 hücrelerinde zencefil muamelesinin en düşük dozda bile (6.25 µg) GLUT4 artırıcı etkisi olduğunu göstermiştir (205). Kırmızı tatlı patates polifenollerinin (500 µg ve 100 µg) insülin direnci oluşturulmuş C2C12 hücreleri ile kullanıldığı bir araştırmada GLUT4 seviyelerinin anlamlı düzeyde yükseldiği görülmüştür (206). Ancak, nar polifenolleri ile yapılan bir çalışmada 3T3-L1 hücrelerinde ürolithin A'nın, FABP4 ve PPAR-γ'nin protein ekspresyonunu azaltan inhibitör aktivitesi göstererek adiponektin ve GLUT4 proteinlerinin gen ekspresyonunu inhibe etme yeteneği bildirilmiştir. Bu etkiler 0,10 ve 50 µL olarak üç farklı konsantrasyonda denenilen elajik asidin PKC-R/ERK/PPARγ/NF-κB yolunu düzenleme kapasitesi ile olan yeteneğine atfedilmiştir (207). Çalışma sonuçlarımız EA'nın öngörülen etkileri açısından literatürle uyumlu bulunmuştur. Ek olarak meme kanseri hücre hatları MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde GLUT4 ifadesinin azalmasının bazal glikoz alımını bozarak, oksidatif fosforilasyonla metabolik yeniden programlamayı teşvik ettiği görülmüştür. Böylece hücre çoğalması ve canlılığının azaldığını göstermiştir (208).

Çalışmamızda farklı konstrasyonlarda uygulanan EA'nın stresör olarak olarak glukozamin uygulamasına karşılık mitokondri membran potansiyeli üzerinde glukozamin ve 10 Mm EA uygulaması dışında daha yüksek konsantrasyonlarda bir fark göstermediği belirlenmiştir. BMAL1'in mitokondriyal dinamikler ve mitokondriyal solunum dahil olmak üzere mitokondriyal fonksiyon için önemli bir düzenleyici olduğu belirtilmektedir (209). Adacıklarda, BMAL1'in silinmesinin mitokondriyal membran potansiyelinin önemli ölçüde azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (210). Ek olarak, BMAL1 mutasyonunun mitokondriyal dinamikleri ve oksidatif metabolizmayı bozarak oksidatif hasara ve metabolik düzensizliğe neden olduğunu bildirilmiştir (209). Bununla birlikte BMAL1 ile düzenlenen SIRT1 ve PGC-1 α 'nın NRF1, mitokondriyal transkripsiyon faktörü A gibi düzenleyicileri aktive ederek mitokondriyal biyogenezi artırabilecekleri bildirilmiştir. BMAL1, SIRT1 ve PGC-1 α 'nın anlatımlarının azalmasının mitokondri membran potansiyelinde hücreleri apoptoze sürüklediği belirtilmektedir. Ek olarak artan BMAL1 seviyelerinin ise ROS miktarı da artsa dahi mitokondri membran potansiyeli üzerinde koruyucu olabildiği gösterilmiştir (211). Bu nedenle, polifenollerin BMAL1 üzerinden etkileri bu alanda araştırılmaya başlanmıştır.

Kapsaisinin (50 μ M) mitokondriyal membran potansiyelinin kaybını hafiflettiği gözlemlenmiştir (139,212). Resveratrol (50 μ M) ve 10 ile 40 μ g/mL konsantrasyonlarında çay polifenolleri ise oksidatif fosforilasyonda rol oynayan transkriptlerle birlikte tüm mitokondriyal solunum komplekslerinin protein ekspresyonunu artırarak etkili olmuştur. Eş zamanlı olarak, resveratrolün, SIRT1 ve PGC-1 α gibi mitokondriyal biyogeneze ilişkili transkriptlerin yanı sıra SIRT1 protein seviyelerinde de artışa neden olduğu; çay polifenollerinin ise mitokondriyal dinamiklerle ilişkili spesifik belirteçlerin transkriptlerinin anlatımını artırdığı ettiği ve SIRT1 proteininin zayıflamış sirkadiyen salınımını yeniden düzenlediği bildirilmiştir (137,213). Bu bulgulara paralel olarak, 40 μ g/mL çay polifenolleri uygulanan insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinin, SIRT1 ve mitokondriyal kompleks proteinleri üzerinde onarıcı etkiler sergilediği görülmüştür (214). Benzer şekilde, benzer bir resveratrol konsantrasyonu ile tedavi edilen insan böbrek HK-2 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, mitokondriyal biyogeneze ilişkili SIRT1/PGC-1 α sinyal yolunun anlatımının artırılması yoluyla, BMAL1 baskılanmasının neden olduğu mitokondriyal membran potansiyeli ve mitokondriyal DNA miktarındaki bozulmaların iyileştirildiği rapor edilmiştir (211). Bu polifenollerin olumlu etkilerinin hem senkronize hem de senkronize olmayan hücrelerde, ayrıca BMAL1'e bağımlı bir

şekilde açıklanmaktadır. Çalışmamızda mitokondri membran potansiyeli üzerinde yüksek konsantrasyonlarda bir fark görülememesi de BMAL1 ve SIRT1/PGC-1 α sinyal yoluyla açıklanmıştır. Glukozaminle artıp EA uygulaması ile kontrol seviyesine geri dönen BMAL1' in mitokondri membran potansiyelini glukozaminle ROS artışı ve/veya ilgili diğer mekanizmalardan hem direk hem de SIRT1/PGC-1 α sinyal yolunu aktive ederek koruyabildiği düşünülmüştür. EA'nın ise oksidatif stresi azaltması ile kontrol seviyesine düşen BMAL1'in işlevlerini rutin düzeyde devam ettirerek hücreler üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu ön görülmektedir.

Çalışmamızda glikozamin uygulaması, kontrol grubuna kıyasla ROS seviyelerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur. EA'nın farklı konsantrasyonlarda uygulanması, GA'nın indüklediği oksidatif stresi doza bağlı olarak baskılamış, ancak bu etki EA dozuna bağlı olarak farklılık göstermiştir. Oksidatif stress antagonistik bir mekanizma ile çalışır. Az düzeyde mitokondriyal ROS mitohormesis adı verilen bir mekanizma aracılığıyla adaptif yanıtları indükleyerek sağlığı ve hücre sağkalımını artırır. Çok yükselmiş ROS düzeylerinin neden olduğu oksidatif hasar ise lipidlerin peroksidasyonu ve proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonu nedeniyle biyomoleküllerin işlevini bozar ve sonuçta geri döndürülemez hücre ölümüne neden olur (215). Polifenoller ROS kaynaklı hücre hasarını azaltmak ve normal seviyelerdeki oksidatif stresin geri beslenme mekanizmalarını sürdürebilmek için uygun teropatik ajanlar olarak görülmektedir (216). Lutein (1-2,5-5 μ M) ile HepG2 hücre hattında yapılan bir çalışmada glikoz ile artırılmış ROS'un doza bağımlı bir şekilde düştüğü gözlemlenmiştir (217). HepG2 hücre hattıyla resveratrol ve kuromanin ile yapılan bir çalışmada ise düşük konsantrasyonlardaki (10 ve 20 μ M) uygulamalar ROS üretimini etkilemese de, daha yüksek konsantrasyonlardaki (40 μ M) ROS seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir. Fakat aynı çalışmada gallik asitin düşük konsantrasyonlarda (10 ve 20 μ M), ROS üretimini azaltıp, daha yüksek konsantrasyonda (40 μ M) Nrf2 üretimini baskılama yoluyla ROS üretimini artırarak etki ettiğini göstermiştir (218). Bu durum polifenollerin ROS üzerindeki etkilerinin farklı mekanizmalar aracılığı ile değişebileceğini göstermektedir. Elajik asit ile yürütülen çalışmalar incelendiğinde chang insan karaciğeri (CHL) hücrelerinde elajik asit (10 μ M) ile yapılan çalışma sonuçlarına göre stresöre karşılık gelen ROS seviyesi azaltılmış ve hücre DNA parçalanmasına karşı korunarak normal seviyelerine dönüş sağlanmıştır (219). HepG2 hücrelerinde elajik asit (50 Mm) ile yürütülen bir çalışmada ise stresöre karşılık ROS seviyesini azalttığı bildirilmiştir (220). Bu etki mekanizması ise

HepG2 hücrelerinde EA'nın Keap1-Nrf-2 aktivasyonunu artırarak ROS'u azalttığına atfedilmiştir (221). Bununla birlikte elajik asit ile hepatoksidite yaratılmış farelerle yürütülen bir çalışmada elajik asitin stresörlere verilen cevaba yönelik olarak artan ROS'u azaltmanın yanında karaciğer hücre hasarını onarmaya ve sinyalleri module etmeye yönelik etkilerinde olduğu bildirilmiştir (222). Bu bulgular, EA'nın doza bağlı antioksidan etkisini ve özellikle orta ve yüksek dozlarda GA kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Sonuçlar, EA'nın hücrel oksidatif stresle ilişkili metabolik bozuklukların önlenmesi veya tedavisinde potansiyel bir ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Polifenolik bileşiklerin antidiyabetik mekanizması çok yönlüdür. Araştırmalar polifenoliklerin insülin direncine karşı etkilerinin farklı moleküler mekanizmaları etkileyerek gösterdiğini bildirmiştir. Örneğin, HepG2 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda kafeik asit ve klorojenik asit (25-100 µg/mL), PI3K/AKT yolunun inaktivasyonunu önleyerek ve GLUT4 düzeylerini artırarak insülin direncini iyileştirici etki göstermiştir (223). Zhenjiang aromatik sirkesinin polifenol açısından zengin özütünün (100-400 µg/mL), fosforile INSR-1 ifadesini inhibe ederek, PI3K/AKT yolunu aktive edebileceği bildirilmiştir (224). Fenolik bileşikler agrimonolid ve desmetilagrmonolid (10-20 µg/mL), AMPK'yi aktive ederek glikoz alımını iyileştirici etkisinin olabileceği gösterilmiştir (225). Ayrıca diyet polifenollerinin antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri aracılığı ile, pankreas β hücrelerinde ROS aracılı hasarı ve NO inhibisyonunu önleyebildiği bildirilmiştir. Polifenollerin, NO üretimini ve artan glikoz alımı için GLUT4 translokasyonunu indüklemek üzere PI3K/Akt/endotel NO sentaz (eNOS) yolunu aktive edebildiği belirtilmektedir (226). EA ve HepG2 hücreleriyle yapılan bir çalışmada ise oksidatif stress aracılı yollar üzerinden insülin direncini etkilediği bildirilmiştir. Oksidatif stresi iyileştirmek için EA keap1-Nrf2 sistemini aktive etmiştir (221). Nrf2 tükenmesi kan glikoz seviyesini artırarak, glikoz intoleransını kötüleştirip, insülin sinyalini bozabilmektedir (227). İnsülin sinyal yolundaki azalmış fosforilasyon ise, insülin direncinin bir özelliğidir. IRS1, insülin reseptörü tirozinkinazının temel hedefidir ve Akt ve ERK gibi aşağı akış enzimlerini ileten metabolizmanın hormonal kontrolü için gereklidir. T2DM karaciğerinde tirozinitte azalmış IRS-1 fosforilasyonu gözlemlenmiştir (228). Elajik asitin bu çalışmada IRS-1 ve Nrf2 aracılığı ile bozulmuş insülin sinyalleme düzenlediği bildirilmiştir. ROS düzeyindeki azalmalar ise bu durumu desteklemiştir (222). Çalışmamızda glikoz alım

deneyi sonuçlarına göre, elajik asitin insülin duyarlılığını artırıcı bir potansiyele sahip olabileceğini, ancak belirli koşullarda insülin direnci ile birlikte uygulandığında farklı mekanizmaların devreye girebileceğini düşündürmektedir. Doza bağımlı bir şekilde glikoz alımını artırması etki mekanizmaları açısından literatürle uyumlu olarak sonuçlanmıştır. Bu etkileri oksidatif stresi azaltıcı etkisine atfedilmiştir. Glukozamin ile yaratılmış olan dirençle uygulanan dozlarda ise glukozaminin etkisiyle azalmış olan alım 10 µg düzeyinde artmış ancak 25 µg ve 50 µg düzeylerinde sırasıyla azalma göstermiştir. Bu durum GLUT4 üzerine olan etki ile açıklanabilmektedir. Elajik asitin yüksek dozları insülin mekanizmasında temel araçlardan olan GLUT4 üzerinde azaltıcı etki göstermektedir. Pankreas beta hücreleri, GLUT4'ün glikoz taşıyıcısı depolama keseciklerinden plazma membranına dağıtımını ve ekzositozunu düzenleyerek glikoz alımını düzenlemek için insülin sentezler ve böylece aktif glikozun hücelere taşınmasını sağlar. Bu nedenle insülin, taşıyıcı aktivitesini artırmak yerine esas olarak plazma membranındaki GLUT4 konsantrasyonunu artırarak glikoz alımını artırır (229). Ancak yüksek oksidatif stress yaratılmış olan hücrelerde EA ile GLUT4 ekspresyonunun azalması glikoz alımında kontrole göre anlamlı ancak azaltıcı bir etki olarak gözlemlenmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma, HepG2 hücrelerinde GA ile indüklenen sirkadiyen ritim bozuklukları ve oksidatif stres üzerine EA uygulamasının potansiyel düzenleyici etkilerini *in vitro* koşullarda ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, GA uygulamasının temel sirkadiyen saat genleri dahil olmak üzere birçok sirkadiyen ritimle ilişkili genin ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir. Özellikle pro-inflamatuvar ve metabolik süreçlerde rol oynayan genlerdeki düzenlemeler dikkat çekicidir. Elajik asit, artan sirkadiyen gen ifadelerini anlamlı düzeyde azaltmış ve oksidatif stresi doza bağlı olarak baskılamıştır. Glikoz alımı üzerindeki çift yönlü etkisi EA'nın metabolik bağlamdaki karmaşık rolünü işaret etmektedir. Mitokondri membran potansiyeli üzerinde anlamlı bir etki gözlemlenmemesi, EA'nın sirkadiyen düzenleyici etkilerinin doğrudan mitokondriyal fonksiyonlardan bağımsız mekanizmalar üzerinden de işleyebileceğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, elajik asitin metabolik stres koşullarında bozulan sirkadiyen ritimlerin ve artan oksidatif stresin düzenlenmesinde potansiyel bir terapötik ajan olarak rol oynayabileceğini desteklemektedir.

Bu çalışmanın bulguları, elajik asitin sirkadiyen ritim ve oksidatif stres üzerindeki etkilerine dair önemli bilgiler sunmakla birlikte, gelecekteki araştırmalar için çeşitli yollar açmaktadır. İlk olarak, elajik asitin sirkadiyen gen ekspresyonunu ve ROS üretimini nasıl düzenlediğine dair altta yatan moleküler mekanizmaların daha detaylı araştırılması gerekmektedir. Özellikle EA'nın hangi sinyal yolları ve transkripsiyon faktörleri üzerinden etki gösterdiği aydınlatılmalıdır. Ayrıca, EA'nın farklı hücre tiplerinde ve metabolik stres modellerinde nasıl etkiler gösterdiği de araştırılmalıdır. *In vitro* bulguların *in vivo* modellerde doğrulanması, elajik asitin sistemik etkileri ve terapötik potansiyeli açısından kritik öneme sahiptir. Gelecekteki araştırmalar, kronik metabolik stres koşullarında uzun süreli EA uygulamasının etkilerini değerlendirmeli ve elajik asitin diğer terapötik ajanlarla kombinasyon halinde kullanımının sinerjik etkilerini araştırmalıdır. Son olarak, preklinik çalışmaların olumlu sonuçlar vermesi durumunda, elajik asitin insan sağlığı üzerindeki etkileri kontrollü klinik çalışmalarla değerlendirilebilir, özellikle metabolik sendrom ve tip 2 diyabet gibi sirkadiyen ritim disregülasyonlarının rol oynadığı durumlarda EA'nın potansiyel faydaları araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Hanafusa K, Hotta T, Iwabuchi K. (2020). Glycolipids: linchpins in the organization and function of membrane microdomains. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 589799.
2. Yang YQ, Meng FY, Liu X, Zhang M, Gu W, Yan HL, et al. (2021). Distinct metabonomic signatures of *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* against glucolipid metabolic disorders. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73(6), 796-807.
3. de Lima EP, Moretti Jr RC, Torres Pomini K, Laurindo LF, Sloan KP, Sloan LA, et al. (2024). Glycolipid Metabolic Disorders, Metainflammation, Oxidative Stress, and Cardiovascular Diseases: Unraveling Pathways. *Biology*, 13(7), 519.
4. Shahwan M, Alhumaydhi F, Ashraf GM, Hasan PM, Shamsi A. (2022). Role of polyphenols in combating Type 2 Diabetes and insulin resistance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 206, 567-579.
5. Matacchione G, Gurău F, Baldoni S, Prattichizzo F, Silvestrini A, Giuliani A, et al. (2020). Pleiotropic effects of polyphenols on glucose and lipid metabolism: Focus on clinical trials. *Ageing Research Reviews*, 61, 101074.
6. Sulaimani N, Houghton MJ, Bonham MP, Williamson G. (2024). Effects of (Poly)phenols on Circadian Clock Gene-Mediated Metabolic Homeostasis in Cultured Mammalian Cells: A Scoping Review. *Advances in Nutrition*, 15(6), 100232.
7. Huang J Qing, Lu M, Ho CT. (2021). Health benefits of dietary chronobiotics: beyond resynchronizing internal clocks. *Food Function*, 12(14), 6136-6156.
8. Neves AR, Albuquerque T, Quintela T, Costa D. (2022). Circadian rhythm and disease: Relationship, new insights, and future perspectives. *Journal of Cell Physiology*, 237(8), 3239-3256.
9. Fishbein AB, Knutson KL, Zee PC. (2021). Circadian disruption and human health. *Journal of Clinical Investigation*. 131(19), Erişim 22.08.2024, <https://www.jci.org/articles/view/148286?ref=healthtips.kr>
10. Sato T, Sato S. (2023). Circadian regulation of metabolism: commitment to health and diseases. *Endocrinology*, 164(7), bqad086.
11. Mamun MAA, Rakib A, Mandal M, Kumar S, Singla B, Singh UP. (2024). Polyphenols: Role in Modulating Immune Function and Obesity. *Biomolecules*, 14(2), 221.
12. Haraguchi A, Du Y, Shiraishi R, Takahashi Y, Nakamura TJ, Shibata S. (2022). Oak extracts modulate circadian rhythms of clock gene expression in vitro and wheel-running activity in mice. *Sleep and Biological Rhythms*, 20(2), 255-266.
13. Mukherjee S, Ghosh S, Choudhury S, Gupta P, Adhikary A, Chattopadhyay S. (2021). Pomegranate polyphenols attenuate inflammation and hepatic damage in tumor-bearing mice: crucial role of NF- κ B and the Nrf2/GSH axis. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 97, 108812.
14. Venkataraman S, Rajendran DS, Kumar PS, Vo DVN, Vaidyanathan VK. (2022). Extraction, purification and applications of biosurfactants based on microbial-derived glycolipids and lipopeptides: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 20(1), 949-970.
15. Jala RCR, Vudhigiri S, Kumar CG. (2022). A comprehensive review on natural occurrence, synthesis and biological activities of glycolipids. *Carbohydrate Research*, 516, 108556.
16. Bange L, Mukhina T, Fragneto G, Rondelli V, Schneck E. (2024). Influence of adhesion-promoting glycolipids on the structure and stability of solid-supported lipid double-bilayers. *Soft Matter*, 20(9), 2113-2125.
17. Adu SA, Twigg MS, Naughton PJ, Marchant R, Banat IM. (2023). Characterisation of cytotoxicity and immunomodulatory effects of glycolipid biosurfactants on human keratinocytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(1), 137-152.
18. Ng YJ, Chan SS, Khoo KS, Munawaroh HSH, Lim HR, Chew KW, et al. (2023). Recent advances and discoveries of microbial-based glycolipids: Prospective alternative for remediation activities. *Biotechnology Advances*, 68, 108198.
19. Zhou Y, Lin X, Yin S, Zhu L, Yang Y, Li Y, et al. (2022). Emerging trends and hot spots in hepatic glycolipid metabolism research from 2002 to 2021: a bibliometric analysis. *Frontiers in Nutrition*, 9, 933211.
20. Gao Q, Zhang K, Fan M, Qian H, Li Y, Wang L. (2024). Effects of short-term carbohydrate deprivation on glycolipid metabolism and hepatic lipid accumulation in mice. *Food Function*. 12(9), Erişim Tarihi: 20.08.2024, <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2024/fo/d3fo05024f>

21. Fan L, Lai R, Ma N, Dong Y, Li Y, Wu Q, et al. (2021). miR-552-3p modulates transcriptional activities of FXR and LXR to ameliorate hepatic glycolipid metabolism disorder. *Journal of Hepatology*, 74(1), 8-19.
22. Bian C, Zhang H, Gao J, Wang Y, Li J, Guo D, et al. (2022). SIRT6 regulates SREBP1c-induced glucolipid metabolism in liver and pancreas via the AMPK α -mTORC1 pathway. *Laboratory Investigation*, 102(5), 474-484.
23. Zhu Y, Jing L, Li X, Zheng D, Zhou G, Zhang Y, et al. (2021). Decabromodiphenyl ether disturbs hepatic glycolipid metabolism by regulating the PI3K/AKT/GLUT4 and mTOR/PPAR γ /RXR α pathway in mice and L02 cells. *Science of the Total Environment*, 763, 142936.
24. Morrow MR, Batchuluun B, Wu J, Ahmadi E, Leroux JM, Mohammadi-Shemirani P, et al. (2022). Inhibition of ATP-citrate lyase improves NASH, liver fibrosis, and dyslipidemia. *Cell Metabolism*, 34(6), 919-936.
25. Jha D, Mitra Mazumder P. (2019). High fat diet administration leads to the mitochondrial dysfunction and selectively alters the expression of class 1 GLUT protein in mice. *Molecular Biology Reports*, 46(2), 1727-1736.
26. Chen X, Shi C, Wang Y, Yu H, Zhang Y, Zhang J, et al. (2022). The mechanisms of glycolipid metabolism disorder on vascular injury in type 2 diabetes. *Frontiers in Physiology*, 13, 952445.
27. Xu LN, Yin LH, Jin Y, Qi Y, Han X, Xu YW, et al. (2020). Effect and possible mechanisms of dioscin on ameliorating metabolic glycolipid metabolic disorder in type-2-diabetes. *Phytomedicine*, 67, 153139.
28. Li J, Yan H, Xiang R, Yang W, Ye J, Yin R, et al. (2022). ATP Secretion and metabolism in regulating pancreatic beta cell functions and hepatic glycolipid metabolism. *Frontiers in Physiology*, 13, 918042.
29. Shen Q, Yang Y Ting, Zhang R Bing, Zhao L Chun, Li W. (2023). Trilobatin ameliorates HFD/STZ-induced glycolipid metabolism disorders through AMPK-mediated pathways. *Journal of Functional Foods*, 103, 105478.
30. Zhou S, Liu J, Li Z, Yang M, Sha R, Yan R, et al. (2024). The effect of different treatment strategies on glycolipid metabolism disorders and cardiovascular events in primary aldosteronism. *Hypertension Research*, 47(6), 1719-1727.
31. Fang X, Miao R, Wei J, Wu H, Tian J. (2022). Advances in multi-omics study of biomarkers of glycolipid metabolism disorder. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 5935-5951.
32. Li L, Yao Y, Zhao J, Cao J, Ma H. (2020). Dehydroepiandrosterone protects against hepatic glycolipid metabolic disorder and insulin resistance induced by high fat via activation of AMPK-PGC-1 α -NRF-1 and IRS1-AKT-GLUT2 signaling pathways. *International Journal of Obesity*, 44(5), 1075-1086.
33. Sies H, Belousov VV, Chandel NS, Davies MJ, Jones DP, Mann GE, et al. (2022). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(7), 499-515.
34. Blesia V, Patel VB, Al-Obaidi H, Renshaw D, Zariwala MG. (2021). Excessive iron induces oxidative stress promoting cellular perturbations and insulin secretory dysfunction in MIN6 beta cells. *Cells*, 10(5), 1141.
35. Yarbeygi H, Sathyapalan T, Atkin SL, Sahebkar A. (2020). Molecular mechanisms linking oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 8609213.
36. Lipke K, Kubis-Kubiak A, Piwowar A. (2022). Molecular mechanism of lipotoxicity as an interesting aspect in the development of pathological states—current view of knowledge. *Cells*, 11(5), 844.
37. López-Acosta O, Ruiz-Ramírez A, Barrios-Maya MÁ, Alarcon-Aguilar J, Alarcon-Enos J, Acuña CLC, et al. (2023). Lipotoxicity, glucotoxicity and some strategies to protect vascular smooth muscle cell against proliferative phenotype in metabolic syndrome. *Food and Chemical Toxicology*, 172, 113546.
38. Jiang JJ, Zhang GF, Zheng JY, Sun JH, Ding SB. (2022). Targeting mitochondrial ROS-mediated ferroptosis by quercetin alleviates high-fat diet-induced hepatic lipotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 876550.
39. Luna-Marco C, Iannantuoni F, Hermo-Argibay A, Devos D, Salazar JD, Víctor VM, et al. (2024). Cardiovascular benefits of SGLT2 inhibitors and GLP-1 receptor agonists through effects on mitochondrial function and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(4), Erişim Tarihi: 21.08.2024, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584924000157>
40. Yarbeygi H, Atkin SL, Sahebkar A. (2019). Mitochondrial dysfunction in diabetes and the regulatory roles of antidiabetic agents on the mitochondrial function. *Journal of Cell Physiology*, 234(6), 8402-8410.
41. Grossini E, Garhwal DP, Calamita G, Romito R, Rigamonti C, Minisini R, et al. (2021). Exposure to plasma from non-alcoholic fatty liver disease patients affects hepatocyte viability, generates mitochondrial dysfunction, and modulates pathways involved in fat accumulation and inflammation. *Frontiers in Medicine*, 8, 693997.

42. Zhang XG, Liu AX, Zhang YX, Zhou MY, Li XY, Fu MH, et al. (2022). A diarylheptanoid compound from *Alpinia officinarum* Hance ameliorates high glucose-induced insulin resistance by regulating PI3K/AKT-Nrf2-GSK3 β signaling pathways in HepG2 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 295, 115397.
43. Botha H, Farah CS, Koo K, Cirillo N, McCullough M, Paolini R, et al. (2021). The role of glucose transporters in oral squamous cell carcinoma. *Biomolecules*, 11(8), 1070.
44. F  rt   L, Marino A, Battault S, Bultot L, Van Steenberg  n A, Bol A, et al. (2021). New insight in understanding the contribution of SGLT1 in cardiac glucose uptake: evidence for a truncated form in mice and humans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 320(2), H838-H853.
45. Leenders F, Groen N, de Graaf N, Engelse MA, Rabelink TJ, de Koning EJ, et al. (2021). Oxidative stress leads to β -cell dysfunction through loss of β -cell identity. *Frontiers in Immunology*, 12, 690379.
46. Zhou L, Liu Y, Wang Z, Liu D, Xie B, Zhang Y, et al. (2021). Activation of NADPH oxidase mediates mitochondrial oxidative stress and atrial remodeling in diabetic rabbits. *Life Sciences*, 272, 119240.
47. Luo M, Zheng Y, Tang S, Gu L, Zhu Y, Ying R, et al. (2023). Radical oxygen species: an important breakthrough point for botanical drugs to regulate oxidative stress and treat the disorder of glycolipid metabolism. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1166178.
48. Rana A, Samtiya M, Dhewa T, Mishra V, Aluko RE. (2022). Health benefits of polyphenols: A concise review. *Journal of Food Biochemistry*, 46(10), e14264.
49. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. (2021). Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*, 13(1), 273.
50. Quero J, M  rmol I, Cerrada E, Rodr  guez-Yoldi MJ. (2020). Insight into the potential application of polyphenol-rich dietary intervention in degenerative disease management. *Food Function*, 11(4), 2805-2825.
51. Krawczyk M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA, Bukowiecka-Matusiak M. (2023). Impact of polyphenols on inflammatory and oxidative stress factors in diabetes mellitus: nutritional antioxidants and their application in improving antidiabetic therapy. *Biomolecules*, 13(9), 1402.
52. Ding S, Xu S, Fang J, Jiang H. (2020). The protective effect of polyphenols for colorectal cancer. *Frontiers in Immunology*, 11, 1407.
53. Abdel-Bakky MS, Mohammed HA, Mahmoud NI, Amin E, Alsharidah M, Al Rugaie O, vd. (2024). Targeting the PI3K/pAKT/mTOR/NF- κ B/FOXO3a signaling pathway for suppressing the development of hepatocellular carcinoma in rats: Role of the natural remedice *Suaeda vermiculata* forssk. *Environ Toxicol*, 12(5), Erişim 21.08.2024, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/tox.24217>
54. Vajdi M, Karimi A, Hassanizadeh S, Farhangi MA, Bagherniya M, Askari G, et al. (2024). Effect of polyphenols against complications of COVID-19: current evidence and potential efficacy. *Pharmacological Reports*, 76(2), 307-327.
55. Tan Y, Tam CC, Rolston M, Alves P, Chen L, Meng S, et al. (2021). Quercetin ameliorates insulin resistance and restores gut microbiome in mice on high-fat diets. *Antioxidants*, 10(8), 1251.
56. Zhu Y, Liu R, Shen Z, Cai G. (2020). Combination of luteolin and lycopene effectively protect against the "two-hit" in NAFLD through Sirt1/AMPK signal pathway. *Life Sciences*, 256, 117990.
57. Sotoudeheian M, Hoseini S. (2023). Therapeutic properties of polyphenols affect AMPK molecular pathway in hyperlipidemia. *Preprints*, 10(2), Erişim 21.08.2024, <https://www.preprints.org/manuscript/202301.0528>
58. Li J, Zhao J, Tian C, Dong L, Kang Z, Wang J, et al. (2024). Mechanisms of regulation of glycolipid metabolism by natural compounds in plants: effects on short-chain fatty acids. *Nutritional Metabolism*, 21(1), 49.
59. Park HS, Lee K, Kim SH, Hong MJ, Jeong NJ, Kim MS. (2020). Luteolin improves hypercholesterolemia and glucose intolerance through LXRA-dependent pathway in diet-induced obese mice. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13358.
60. Dong L, Qin C, Li Y, Wu Z, Liu L. (2022). Oat phenolic compounds regulate metabolic syndrome in high fat diet-fed mice via gut microbiota. *Food Biosciences*, 50, 101946.
61. Jia Y, Liu Y, Wu Y, Feng C, Zhang H, Ren F, vd. (2024). The regulation of glucose and lipid metabolism through the interaction of dietary polyphenols and polysaccharides via the gut microbiota pathway. *Food Funct*, 9(5), Erişim 21.08.2024, <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2024/fo/d4fo00585f>
62. Shon JC, Kim WC, Ryu R, Wu Z, Seo JS, Choi MS, et al. (2020). Plasma lipidomics reveals insights into anti-obesity effect of *Chrysanthemum morifolium* Ramat leaves and its constituent luteolin in high-fat diet-induced dyslipidemic mice. *Nutrients*, 12(10), 2973.
63. Wang R, Zhang L, Zhang Q, Zhang J, Liu S, Li C, et al. (2022). Glycolipid metabolism and metagenomic analysis of the therapeutic effect of a phenolics-rich extract from Noni fruit on type 2 diabetic mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(9), 2876-2888.

64. Tain YL, Chang SK, Liao JX, Chen YW, Huang HT, Li YL, et al. (2021). Synthesis of short-chain-fatty-acid resveratrol esters and their antioxidant properties. *Antioxidants*, 10(3), 420.
65. Wang LF, Li WJ, Zhang XY, Zhang YC, Chen GF, Zhou XY, et al. (2024). Resveratrol prevents age-related heart impairment through inhibiting the Notch/NF- κ B pathway. *Food Science and Nutrition*, 12(2), 1035-1045.
66. Gao X, Zhao X, Liu M, Zhao H, Sun Y. (2023). Lycopene prevents non-alcoholic fatty liver disease through regulating hepatic NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway and intestinal microbiota in mice fed with high-fat and high-fructose diet. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1120254.
67. Zhang M, Cui C, Lin Y, Cai J. (2021). Ameliorating effect on glycolipid metabolism and chemical profile of *Millettia speciosa* Champ. extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 279, 114360.
68. Yi X, Gao X, Zhang X, Xia G, Shen X. (2023). Preparation of liposomes by glycolipids/phospholipids as wall materials: Studies on stability and digestibility. *Food Chemistry*, 402, 134328.
69. Magangana TP, Makunga NP, Fawole OA, Opara UL. (2020). Processing factors affecting the phytochemical and nutritional properties of *Punica granatum* L. peel waste: A review. *Molecules*, 25(20), 4690.
70. Bar-Ya'akov I, Tian L, Amir R, Holland D. (2019). Primary metabolites, anthocyanins, and hydrolyzable tannins in the *Punica granatum* fruit. *Frontiers in Plant Science*, 10, 620.
71. Benchagra L, Berrougui H, Islam MO, Ramchoun M, Boulbaroud S, Hajjaji A, et al. (2021). Antioxidant effect of Moroccan *Punica granatum* (L.) Sefri variety extracts rich in punicalagin against the oxidative stress process. *Foods*, 10(9), 2219.
72. Barati Boldaji R, Akhlaghi M, Sagheb MM, Esmaeilinezhad Z. (2020). Pomegranate juice improves cardiometabolic risk factors, biomarkers of oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients: A randomized crossover trial. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 846-854.
73. Sohrab G, Roshan H, Ebrahimof S, Nikpayam O, Sotoudeh G, Siasi F. (2019). Effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and lipid profile in patients with type 2 diabetes: A single-blind randomized clinical trial. *Clinical Nutrition ESPEN*, 29, 30-35.
74. Achraf A, Hamdi C, Turki M, Abdelkarim O, Ayadi F, Hoekelmann A, et al. (2018). Natural pomegranate juice reduces inflammation, muscle damage and increases platelets blood levels in active healthy Tunisian aged men. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(1), 45-48.
75. Feng X, Yang Q, Wang C, Tong W, Xu W. (2020). Punicalagin exerts protective effects against ankylosing spondylitis by regulating NF- κ B-TH17/JAK2/STAT3 signaling and oxidative stress. *BioMed Research International*, 2020(1), 4918239.
76. Cisneros-Zevallos L, Bang WY, Delgadillo-Puga C. (2020). Ellagic acid and urolithins A and B differentially regulate fat accumulation and inflammation in 3T3-L1 adipocytes while not affecting adipogenesis and insulin sensitivity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2086.
77. Zhang X, Du L, Zhang W, Yang M, Chen L, Hou C, et al. (2022). Pomegranate peel polyphenols alleviate insulin resistance through the promotion of insulin signaling pathway in skeletal muscle of metabolic syndrome rats. *Food Science and Human Wellness*, 11(4), 1076-1085.
78. Sun YQ, Tao X, Men XM, Xu ZW, Tian W. (2017). In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(8), 1808-1818.
79. Nyamba I, Lechanteur A, Semdé R, Evrard B. (2021). Physical formulation approaches for improving aqueous solubility and bioavailability of ellagic acid: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 159, 198-210.
80. Ahmadi S, Javid H. (2023). Novel formulations of ellagic acid for the improvement of antimicrobial, antioxidant, anticancer, antidiabetic, and neuroprotective applications. *Nano Micro Biosystems*, 2(1), 31-35.
81. Zhang M, Cui S, Mao B, Zhang Q, Zhao J, Zhang H, ve diğerleri. (2023). Ellagic acid and intestinal microflora metabolite urolithin A: A review on its sources, metabolic distribution, health benefits, and biotransformation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(24), 6900-6922.
82. Alfei S, Marengo B, Zuccari G. (2020). Oxidative stress, antioxidant capabilities, and bioavailability: Ellagic acid or urolithins? *Antioxidants*, 9(8), 707.
83. González-Sarrias A, García-Villalba R, Núñez-Sánchez MÁ, Tomé-Carneiro J, Zafrilla P, Mulero J, ve diğerleri. (2015). Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. *Journal of Functional Foods*, 19, 225-235.
84. Gu W, Kong R, Qi S, Cheng X, Cai X, Zhou Z, ve diğerleri. (2024). Sono-assembly of ellagic acid into nanostructures significantly enhances aqueous solubility and bioavailability. *Food Chemistry*, 442, 138485.

85. Rawat V, Jain V. (2023). Formulation, Optimization and Characterization of Ellagic Acid Phyto-Vesicular System For Bioavailability Enhancement. *Indian Drugs*, 60, Erişim 21.08.2024, https://www.academia.edu/download/106976082/July_2023_60_7_42-49.pdf.
86. Kumar A, Kaushik P, Incerpi S, Pedersen JZ, Goel S, Prasad AK, (2021). Evaluation of the free radical scavenging activities of ellagic acid and ellagic acid peracetate by EPR spectrometry. *Molecules*, 26(16), 4800.
87. Nowak M, Tryniszewski W, Sarniak A, Wlodarczyk A, Nowak PJ, Nowak D. (2022). Concentration dependence of anti-and pro-oxidant activity of polyphenols as evaluated with a light-emitting System. *Molecules*, 27(11), 3453.
88. Naraki K, Rahbardar MG, Ajiboye BO, Hosseinzadeh H. (2023). The effect of ellagic acid on the metabolic syndrome: A review article. *Heliyon*, 9, Erişim 21.08.2024, [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(23\)09052-7](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(23)09052-7).
89. Yari MG, Foroughi F, Hashemipour S, Nooshabadi MR, Ahmadi MH, Nezhad BA, ve diğerleri. (2024). Effects of ellagic acid supplementation on glycemic index and insulin resistance in type 2 diabetics: A double blind randomized clinical trial. *Koomesh*, 23(5), 582-590.
90. Hidalgo-Lozada GM, Villarruel-López A, Martínez-Abundis E, Vázquez-Paulino O, González-Ortiz M, Pérez-Rubio KG. (2022). Ellagic acid effect on the components of metabolic syndrome, insulin sensitivity and insulin secretion: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Clinical Medicine*, 11(19), 5741.
91. Chen C, Tan S, Ren T, Wang H, Dai X, Wang H. (2022). Polyphenol from *Rosa roxburghii* Tratt fruit ameliorates the symptoms of diabetes by activating the P13K/AKT insulin pathway in db/db mice. *Foods*, 11(5), 636.
92. Elseweidy MM, Elesawy AE, Sobh MS, Elnagar GM. (2022). Ellagic acid ameliorates high fructose-induced hyperuricemia and non-alcoholic fatty liver in Wistar rats: Focusing on the role of C1q/tumor necrosis factor-related protein-3 and ATP citrate lyase. *Life Sciences*, 305, 120751.
93. Cisneros-Zevallos L, Bang WY, Delgadillo-Puga C. (2020). Ellagic acid and urolithins A and B differentially regulate fat accumulation and inflammation in 3T3-L1 adipocytes while not affecting adipogenesis and insulin sensitivity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2086.
94. Rahimi Naiini M, Shahouzehi B, Khaksari M, Azizi S, Naghibi N, Nazari-Robati M. (2023). Ellagic acid reduces hepatic lipid contents through regulation of SIRT1 and AMPK in old rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-8.
95. Mirzaie Z, Bastani A, Hesami S, Pouryousefi E, Kavianpour M, Haghighian HK. (2021). Improving effect of ellagic acid on sleep quality and gastrointestinal symptoms in patient with irritable bowel syndrome: randomized double-blind clinical trial. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 32(11), 937.
96. Albrecht U. (2020). Molecular connections between circadian clocks and mood-related behaviors. *Journal of Molecular Biology*, 432(12), 3714-3721.
97. Fagiani F, Di Marino D, Romagnoli A, Travelli C, Voltan D, Di Cesare Mannelli L, ve diğerleri. (2022). Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 41.
98. Zhu X, Maier G, Panda S. (2024). Learning from circadian rhythm to transform cancer prevention, prognosis, and survivorship care. *Trends in Cancer*, Erişim 22.08.2024, [https://www.cell.com/trends/cancer/fulltext/S2405-8033\(23\)00230-3](https://www.cell.com/trends/cancer/fulltext/S2405-8033(23)00230-3).
99. Ruan W, Yuan X, Eltzschig HK. (2021). Circadian rhythm as a therapeutic target. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(4), 287-307.
100. Qu M, Duffy T, Hirota T, Kay SA. (2018). Nuclear receptor HNF4A transrepresses CLOCK:BMAL1 and modulates tissue-specific circadian networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, Erişim 22.08.2024, <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1816411115>.
101. Green CB. (2018). Circadian posttranscriptional regulatory mechanisms in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(6), a030692.
102. Kulkarni SS, Singh O, Zigman JM. (2024). The intersection between ghrelin, metabolism and circadian rhythms. *Nature Reviews Endocrinology*, 20(4), 228-238.
103. Lananna BV, Musiek ES. (2020). The wrinkling of time: Aging, inflammation, oxidative stress, and the circadian clock in neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, 139, 104832.
104. Xia Y, Yao B, Fu Z, Li L, Jin S, Qu B, ve diğerleri. (2023). Clock genes regulate skeletal muscle energy metabolism through NAMPT/NAD/SIRT1 following heavy-load exercise. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 325(5), R490-R503.
105. Plano SA, Baidanoff FM, Trebucq LL, Suarez SA, Doctorovich F, Golombek DA, ve diğerleri. (2021). Redox and antioxidant modulation of circadian rhythms: effects of nitroxyl, N-acetylcysteine and glutathione. *Molecules*, 26(9), 2514.

106. Wada T, Yamamoto Y, Takasugi Y, Ishii H, Uchiyama T, Saitoh K, ve diğerleri. (2022). Adiponectin regulates the circadian rhythm of glucose and lipid metabolism. *Journal of Endocrinology*, 254(2), 121-133.
107. Kinoshita Y, Takahashi H, Katsumata M. (2022). Circadian rhythms of the mRNA abundances of clock genes and glucose transporters in the jejunum of weanling-growing pigs. *Veterinary Medicine and Science*, 8(3), 1113-1118.
108. Chen M, Lin Y, Dang Y, Xiao Y, Zhang F, Sun G, ve diğerleri. (2023). Reprogramming of rhythmic liver metabolism by intestinal clock. *Journal of Hepatology*, 79(3), 741-757.
109. Saran AR, Dave S, Zarrinpar A. (2020). Circadian rhythms in the pathogenesis and treatment of fatty liver disease. *Gastroenterology*, 158(7), 1948-1966.
110. Petrenko V, Sinturel F, Riezman H, Dibner C. (2023). Lipid metabolism around the body clocks. *Progress in Lipid Research*, 91, 101235.
111. Geiger SS, Traba J, Richoz N, Farley TK, Brooks SR, Petermann F, ve diğerleri. (2021). Feeding-induced resistance to acute lethal sepsis is dependent on hepatic BMAL1 and FXR signalling. *Nature Communications*, 12(1), 2745.
112. Li J, Wei L, Zhao C, Li J, Liu Z, Zhang M, ve diğerleri. (2019). Resveratrol maintains lipid metabolism homeostasis via one of the mechanisms associated with the key circadian regulator Bmal1. *Molecules*, 24(16), 2916.
113. Zhang Z, Xin H, Li M. (2020). Circadian Rhythm of Lipid Metabolism in Health and Disease. *Small Methods*, 4(7), 1900601.
114. Liu L, Liu L, Deng S, Zou L, He Y, Zhu X, ve diğerleri. (2024). Circadian Rhythm Alteration of the Core Clock Genes and the Lipid Metabolism Genes Induced by High-Fat Diet (HFD) in the Liver Tissue of the Chinese Soft-Shell Turtle (*Trionyx sinensis*). *Genes*, 15(2), 157.
115. Heng X, Wang Z, Li L, Yang L, Huang S. (2022). Mechanisms of Dangua Recipe in Improving Glycolipid Metabolic Disorders Based on Transcriptomics. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 28(2), 130-137.
116. Takahashi M, Ozaki M, Tsubosaka M, Kim HK, Sasaki H, Matsui Y, ve diğerleri. (2020). Effects of timing of acute and consecutive catechin ingestion on postprandial glucose metabolism in mice and humans. *Nutrients*, 12(2), 565.
117. Zhang Y, Cheng L, Liu Y, Zhang R, Wu Z, Cheng K, ve diğerleri. (2022). Omics Analyses of Intestinal Microbiota and Hypothalamus Clock Genes in Circadian Disturbance Model Mice Fed with Green Tea Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(6), 1890-1901.
118. Mi Y, Qi G, Gao Y, Li R, Wang Y, Li X, ve diğerleri. (2017). (-)-Epigallocatechin-3-gallate Ameliorates Insulin Resistance and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells: Involvement of Bmal1. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(12), 1700440.
119. Mi Y, Qi G, Fan R, Ji X, Liu Z, Liu X. (2017). EGCG ameliorates diet-induced metabolic syndrome associating with the circadian clock. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(6), 1575-1589.
120. Peng J, Lu C, Luo Y, Su X, Li S, Ho CT. (2024). Hypoglycemic effects and associated mechanisms of resveratrol and related stilbenes in diet. *Food & Function*, Erişim 22.08.2024, <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2024/fo/d3fo04761j>.
121. Koh Y, Yao C, Lee P, Nagabhushanam K, Ho C, Pan M. (2024). Hepatoprotective effect of dietary pterostilbene against high-fat-diet-induced lipid accumulation exacerbated by chronic jet lag via SIRT1 and SIRT3 activation. *Phytotherapy Research*, 38(8), 4099-4113.
122. Li R, Xiao J, Cao Y, Huang Q, Ho CT, Lu M. (2022). Capsaicin Attenuates Oleic Acid-Induced Lipid Accumulation via the Regulation of Circadian Clock Genes in HepG2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(3), 794-803.
123. Hirai T, Mitani Y, Kurumisawa K, Nomura K, Wang W, Nakashima K, ve diğerleri. (2019). Berberine stimulates fibroblast growth factor 21 by modulating the molecular clock component brain and muscle Arnt-like 1 in brown adipose tissue. *Biochemical Pharmacology*, 164, 165-176.
124. El-Masry SA, Farid MN, Hassan NE, Soliman MAT, Mekki LH, Elashry GI, ve diğerleri. (2024). Fibroblast growth factor-21 and Visfatin as potential predictors for metabolic risk factors in obese children. *Scientific Reports*, 14(1), 1190.
125. Cortés-Espinar AJ, Ibarz-Blanch N, Soliz-Rueda JR, Bonafos B, Feillet-Coudray C, Casas F, ve diğerleri. (2023). Rhythm and ROS: Hepatic Chronotherapeutic Features of Grape Seed Proanthocyanidin Extract Treatment in Cafeteria Diet-Fed Rats. *Antioxidants*, 12(8), 1606.
126. Manocchio F, Soliz-Rueda JR, Ribas-Latre A, Bravo FI, Arola-Arnal A, Suarez M, ve diğerleri. (2022). Grape Seed Proanthocyanidins Modulate the Hepatic Molecular Clock via MicroRNAs. *Molecular Nutrition & Food Research*, 66(23), 2200443.

127. Jahan S, Ansari UA, Srivastava AK, Aldosari S, Alabdallat NG, Siddiqui AJ, ve diğerleri. (2024). A protein-miRNA biomic analysis approach to explore neuroprotective potential of nobiletin in human neural progenitor cells (hNPCs). *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1343569.
128. Wang X, Zhou X, Zhang X. (2024). Effects of Ellagic Acid on Glucose and Lipid Metabolism: A Systematic Review and Meta-Analysis. Sahar A, editör. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2024(1), 5558665.
129. Shi R, Zhou N, Zhang H, Gong M, Han L. (2022). Bioaffinity ultrafiltration coupled with HPLC-ESI-MS/MS for screening potential α -glucosidase inhibitors from pomegranate peel. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1014862.
130. Lin W, Liu G, Kang X, Guo P, Shang Y, Du R, ve diğerleri. (2021). Ellagic acid inhibits high glucose induced injury in rat mesangial cells via the PI3K/Akt/FOXO3a signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(3), 1017.
131. Harakeh S, Almuhayawi M, Al Jaouni S, Almasaudi S, Hassan S, Al Amri T, ve diğerleri. (2020). Antidiabetic effects of novel ellagic acid nanoformulation: Insulin-secreting and anti-apoptosis effects. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3474-3480.
132. Velagapudi R, Lepiarz I, El-Bakoush A, Katola FO, Bhatia H, Fiebich BL, ve diğerleri. (2019). Induction of Autophagy and Activation of SIRT-1 Deacetylation Mechanisms Mediate Neuroprotection by the Pomegranate Metabolite Urolithin A in BV2 Microglia and Differentiated 3D Human Neural Progenitor Cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(10), 1801237.
133. Du Y, Chen X, Kajiwarra S, Orihara K. (2024). Effect of Urolithin A on the Improvement of Circadian Rhythm Dysregulation in Intestinal Barrier Induced by Inflammation. *Nutrients*, 16(14), 2263.
134. Mi Y, Qi G, Gao Y, Li R, Wang Y, Li X, ve diğerleri. (2017). (-)-Epigallocatechin-3-gallate Ameliorates Insulin Resistance and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells: Involvement of Bmal1. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(12), 1700440.
135. Mei L, Zheng Y, Ma T, Xia B, Gao X, Hao Y, ve diğerleri. (2021). (-)-Epigallocatechin-3-gallate Ameliorates Intervertebral Disc Degeneration Through Reprogramming of the Circadian Clock. *Frontiers in Pharmacology*, 12, Erişim 18.01.2025, <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2021.753548/full>.
136. Qi G, Mi Y, Fan R, Zhao B, Ren B, Liu X. (2017). Tea polyphenols ameliorates neural redox imbalance and mitochondrial dysfunction via mechanisms linking the key circadian regular Bmal1. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 189-199.
137. Qi G, Wu W, Mi Y, Shi R, Sun K, Li R, ve diğerleri. (2018). Tea polyphenols direct Bmal1-driven ameliorating of the redox imbalance and mitochondrial dysfunction in hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 122, 181-193.
138. Guo R, Zhao B, Wang Y, Wu D, Wang Y, Yu Y, ve diğerleri. (2018). Cichoric Acid Prevents Free-Fatty-Acid-Induced Lipid Metabolism Disorders via Regulating Bmal1 in HepG2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(37), 9667-9678.
139. Li R, Xiao J, Cao Y, Huang Q, Ho CT, Lu M. (2022). Capsaicin Attenuates Oleic Acid-Induced Lipid Accumulation via the Regulation of Circadian Clock Genes in HepG2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(3), 794-803.
140. Lu M, Lan Y, Xiao J, Song M, Chen C, Liang C, ve diğerleri. (2019). Capsaicin Ameliorates the Redox Imbalance and Glucose Metabolism Disorder in an Insulin-Resistance Model via Circadian Clock-Related Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(36), 10089-10096.
141. Li J, Wei L, Zhao C, Li J, Liu Z, Zhang M, ve diğerleri. (2019). Resveratrol Maintains Lipid Metabolism Homeostasis via One of the Mechanisms Associated with the Key Circadian Regulator Bmal1. *Molecules*, 24(16), 2916.
142. Chatam O, Chapnik N, Froy O. (2022). Resveratrol Induces the Fasting State and Alters Circadian Metabolism in Hepatocytes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 77(1), 128-134.
143. Li MD, Ruan HB, Hughes ME, Lee JS, Singh JP, Jones SP, ve diğerleri. (2013). O-GlcNAc Signaling Entrain the Circadian Clock by Inhibiting BMAL1/CLOCK Ubiquitination. *Cell Metabolism*, 17(2), 303-310.
144. Ma YT, Luo H, Guan WJ, Zhang H, Chen C, Wang Z, ve diğerleri. (2013). O-GlcNAcylation of BMAL1 regulates circadian rhythms in NIH3T3 fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(3), 382-387.
145. Li Z, Fu B, Wei A, Wu Y, Huang M, Zhang E, ve diğerleri. (2023). d-Glucosamine induces circadian phase delay by promoting BMAL1 degradation through AMPK/mTOR pathway. *Life Sciences*, 325, 121765.
146. Lam C, Low JY, Tran PT, Wang H. (2021). The hexosamine biosynthetic pathway and cancer: Current knowledge and future therapeutic strategies. *Cancer Letters*, 503, 11-18.

147. He B, Nohara K, Park N, Park YS, Guillory B, Zhao Z, ve diğerleri. (2016). The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome. *Cell Metabolism*, 23(4), 610-621.
148. Kim E, Mawatari K, Yoo SH, Chen Z. (2023). The Circadian Nobiletin-ROR Axis Suppresses Adipogenic Differentiation and I κ B α /NF- κ B Signaling in Adipocytes. *Nutrients*, 15(18), 3919.
149. Mawatari K, Koike N, Nohara K, Wirianto M, Uebanso T, Shimohata T, ve diğerleri. (2023). The Polymethoxyflavone Sudachitin Modulates the Circadian Clock and Improves Liver Physiology. *Molecular Nutrition & Food Research*, 67(9), 2200270.
150. Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, ve diğerleri. (2009). AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation. *Science*, 326(5951), 437-440.
151. Park I, Lee Y, Kim HD, Kim K. (2014). Effect of Resveratrol, a SIRT1 Activator, on the Interactions of the CLOCK/BMAL1 Complex. *Endocrinology and Metabolism*, 29(3), 379-387.
152. Wang Y, Song B, Chen J, Cao J, Li X, Sun C. (2021). Polymethoxyflavones in Citrus Regulate Lipopolysaccharide-Induced Oscillating Decay of Circadian Rhythm Genes by Inhibiting Nlrp3 Expression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1), 8419415.
153. He B, Nohara K, Park N, Park YS, Guillory B, Zhao Z, Garcia JM, Koike N, Lee CC, Takahashi JS, Yoo SH, Chen Z. (2016). The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome. *Cell Metabolism*, 23(4), 610-621. Erişim Tarihi 03.01.2025, [https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131\(16\)30110-3](https://www.cell.com/cell-metabolism/fulltext/S1550-4131(16)30110-3).
154. Lellupitiyage Don SS, Robertson KL, Lin HH, Labriola C, Harrington ME, Taylor SR, ve diğerleri. (2020). Nobiletin affects circadian rhythms and oncogenic characteristics in a cell-dependent manner. Cermakian N, editör. *PLoS ONE*, 15(7), e0236315.
155. Sarma A, Sharma VP, Sarkar AB, Sekar MC, Samuel K, Geusz ME. (2016). The circadian clock modulates anti-cancer properties of curcumin. *BMC Cancer*, 16(1), 759.
156. Tan X, Li L, Wang J, Zhao B, Pan J, Wang L, ve diğerleri. (2019). Resveratrol Prevents Acrylamide-Induced Mitochondrial Dysfunction and Inflammatory Responses via Targeting Circadian Regulator Bmal1 and Cry1 in Hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(31), 8510-8519.
157. Ye P, Li W, Huang X, Zhao S, Chen W, Xia Y, ve diğerleri. (2022). BMAL1 regulates mitochondrial homeostasis in renal ischaemia-reperfusion injury by mediating the SIRT1/PGC-1 α axis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(7), 1994-2009.
158. Li J, Wei L, Zhao C, Li J, Liu Z, Zhang M, ve diğerleri. (2019). Resveratrol Maintains Lipid Metabolism Homeostasis via One of the Mechanisms Associated with the Key Circadian Regulator Bmal1. *Molecules*, 24(16), 2916.
159. Amin M, Gragnoli C. (2023). Melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene linkage and association to type 2 diabetes in Italian families. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 27(10), 4688-4692.
160. Yu S, Tang Q, Chen G, Lu X, Yin Y, Xie M, ve diğerleri. (2022). Circadian rhythm modulates endochondral bone formation via MTR1/AMPK β 1/BMAL1 signaling axis. *Cell Death & Differentiation*, 29(4), 874-887.
161. Hassan Malla Khedir M, Saeed A, Abushouk A, A Mohammed N, Elshiekh M. (2021). Expression and Association of MTNR1A Gene and Circadian Clock Genes in Different Stages of Breast Cancer in MCF - 7 Breast Cancer Line. *International Journal of Scientific Research (IJSR)*, 10(9), 1128-1134.
162. Matheson CJ, Backos DS, Reigan P. (2016). Targeting WEE1 Kinase in Cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(10), 872-881.
163. Liu H, Du T, Li C, Yang G. (2021). STAT3 phosphorylation in central leptin resistance. *Nutrition & Metabolism*, 18(1), 39.
164. Aziz MdA, Sarwar MdS, Akter T, Uddin MdS, Xun S, Zhu Y, ve diğerleri. (2021). Polyphenolic molecules targeting STAT3 pathway for the treatment of cancer. *Life Sciences*, 268, 118999.
165. Li LW, Na C, Tian SY, Chen J, Ma R, Gao Y, ve diğerleri. (2018). Ellagic acid induces HeLa cell apoptosis via regulating signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(1), 29-36.
166. Xu YY, Wang WW, Huang J, Zhu WG. (2020). Ellagic acid induces esophageal squamous cell carcinoma cell apoptosis by modulating SHP-1/STAT3 signaling. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 36(9), 699-704.
167. Eskandari E, Heidarian E, Amini SA, Saffari-Chaleshtori J. (2016). Evaluating the effects of ellagic acid on pSTAT3, pAKT, and pERK1/2 signaling pathways in prostate cancer PC3 cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(4), 1266.

168. Zeng H, Qin H, Liao M, Zheng E, Luo X, Xiao A, ve diğerleri. (2022). CD36 promotes de novo lipogenesis in hepatocytes through INSIG2-dependent SREBP1 processing. *Molecular Metabolism*, 57, 101428.
169. Yan C, Zhang Y, Zhang X, Aa J, Wang G, Xie Y. (2018). Curcumin regulates endogenous and exogenous metabolism via Nrf2-FXR-LXR pathway in NAFLD mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 274-281.
170. Wu Y, Wang M, Yang T, Qin L, Hu Y, Zhao D, ve diğerleri. (2021). Cinnamic Acid Ameliorates Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Suppressing Hepatic Lipogenesis and Promoting Fatty Acid Oxidation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)*, 2021, 9561613.
171. Liu L, Gao C, Yao P, Gong Z. (2015). Quercetin Alleviates High-Fat Diet-Induced Oxidized Low-Density Lipoprotein Accumulation in the Liver: Implication for Autophagy Regulation. *BioMed Research International*, 2015, 607531.
172. Furuhashi M, Ura N, Nakata T, Shimamoto K. (2003). Insulin sensitivity and lipid metabolism in human CD36 deficiency. *Diabetes Care*, 26(2), 471-474.
173. Nassir F, Adewole OL, Brunt EM, Abumrad NA. (2013). CD36 deletion reduces VLDL secretion, modulates liver prostaglandins, and exacerbates hepatic steatosis in ob/ob mice. *Journal of Lipid Research*, 54(11), 2988-2997.
174. Yang P, Zeng H, Tan W, Luo X, Zheng E, Zhao L, ve diğerleri. (2020). Loss of CD36 impairs hepatic insulin signaling by enhancing the interaction of PTP1B with IR. *The FASEB Journal*, 34(4), 5658-5672.
175. Zhong S, Zhao L, Wang Y, Zhang C, Liu J, Wang P, ve diğerleri. (2017). Cluster of Differentiation 36 Deficiency Aggravates Macrophage Infiltration and Hepatic Inflammation by Upregulating Monocyte Chemotactic Protein-1 Expression of Hepatocytes Through Histone Deacetylase 2-Dependent Pathway. *Antioxidants & Redox Signaling*, 27(4), 201-214.
176. Wang B, Tontonoz P. (2018). Liver X receptors in lipid signalling and membrane homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(8), 452-463.
177. Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R, He J, ve diğerleri. (2008). Hepatic Fatty Acid Transporter Cd36 Is a Common Target of LXR, PXR, and PPAR γ in Promoting Steatosis. *Gastroenterology*, 134(2), 556-567.e1.
178. Hajri T, Zaiou M, Fungwe TV, Ouguerram K, Besong S. (2021). Epigenetic Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Mediates High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Cells*, 10(6), 1355.
179. Murase T, Misawa K, Minegishi Y, Aoki M, Ominami H, Suzuki Y, ve diğerleri. (2011). Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(1), E122-E133.
180. Lu Y, Zhang C, Song Y, Chen L, Chen X, Zheng G, ve diğerleri. (2023). Gallic acid impairs fructose-driven de novo lipogenesis and ameliorates hepatic steatosis via AMPK-dependent suppression of SREBP-1/ACC/FASN cascade. *European Journal of Pharmacology*, 940, 175457.
181. Li J, Wei L, Zhao C, Li J, Liu Z, Zhang M, ve diğerleri. (2019). Resveratrol Maintains Lipid Metabolism Homeostasis via One of the Mechanisms Associated with the Key Circadian Regulator Bmal1. *Molecules*, 24, 2916.
182. Lee GH, Peng C, Jeong SY, Park SA, Lee HY, Hoang TH, ve diğerleri. (2021). Ginger extract controls mTOR-SREBP1-ER stress-mitochondria dysfunction through AMPK activation in obesity model. *Journal of Functional Foods*, 87, 104628.
183. Han JY, Park SH, Yang JH, Kim MG, Cho SS, Yoon G, ve diğerleri. (2014). Licochalcone Suppresses LXR α -Induced Hepatic Lipogenic Gene Expression through AMPK/Sirt1 Pathway Activation. *Toxicological Research*, 30(1), 19-25.
184. He C, Quan W, Zeng Y, Zhou H, You P, Li Z, ve diğerleri. (2023). Construction of nicotinic acid curcumin nanoparticles and its Anti-atherosclerosis effect via PCSK9/LDL-R, ABCA1/Caveolin-1/LXR pathway. *Materials & Design*, 229, 111931.
185. Li J, Wei L, Zhao C, Li J, Liu Z, Zhang M, ve diğerleri. (2019). Resveratrol Maintains Lipid Metabolism Homeostasis via One of the Mechanisms Associated with the Key Circadian Regulator Bmal1. *Molecules*, 24, 2916.
186. Tanyanskiy DA, Shavva VS, Dizhe EB, Oleinikova GN, Lizunov AV, Nekrasova EV, ve diğerleri. (2022). Adiponectin Stimulates Apolipoprotein A-1 Gene Expression in HepG2 Cells via AMPK, PPAR α , and LXRs Signaling Mechanisms. *Biochemistry (Moscow)*, 87(11), 1252-1259.

187. Tenore GC, Calabrese G, Stiuso P, Ritieni A, Giannetti D, Novellino E. (2014). Effects of Annurca apple polyphenols on lipid metabolism in HepG2 cell lines: A source of nutraceuticals potentially indicated for the metabolic syndrome. *Food Research International*, 63, 252-257.
188. Zhai Q, Zhong N, Gao HQ, Li BY, Jiang B. (Belirtilmemiş). Grape seed proanthocyanidins extracts promote apolipoprotein A-I mRNA expression in HepG2 cells under experimental sugar and high-sugar conditions.
189. Farzin L, Asghari S, Rafrat M, Asghari-Jafarabadi M, Shirmohammadi M. (2019). No beneficial effects of resveratrol supplementation on atherogenic risk factors in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 22, Erişim 18.01.2025, <https://econtent.hogrefe.com/doi/10.1024/0300-9831/a000528>.
190. Mahdavi A, Bagherniya M, Fakheran O, Reiner Ž, Xu S, Sahebkar A. (2020). Medicinal plants and bioactive natural compounds as inhibitors of HMG-CoA reductase: A literature review. *BioFactors*, 46(6), 906-926.
191. Huang J, Feng S, Liu A, Dai Z, Wang H, Reuhl K, ve diğerleri. (2018). Green tea polyphenol EGCG alleviates metabolic abnormality and fatty liver by decreasing bile acid and lipid absorption in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(4), 10.1002/mnfr.201700696.
192. Xiao P, Ji H, Ye Y, Zhang B, Chen Y, Tian J, ve diğerleri. (2017). Dietary silymarin supplementation promotes growth performance and improves lipid metabolism and health status in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed diets with elevated lipid levels. *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(1), 245-263.
193. Leng E, Xiao Y, Mo Z, Li Y, Zhang Y, Deng X, ve diğerleri. (2018). Synergistic effect of phytochemicals on cholesterol metabolism and lipid accumulation in HepG2 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 122.
194. Taylor BA, Thompson PD. (2015). Muscle-related side-effects of statins: from mechanisms to evidence-based solutions. *Current Opinion in Lipidology*, 26(3), 221.
195. Luo J, Yang H, Song BL. (2020). Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 225-245.
196. Luo K, Ma C, Xing S, An Y, Feng J, Dang H, ve diğerleri. (2020). White tea and its active polyphenols lower cholesterol through reduction of very-low-density lipoprotein production and induction of LDLR expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110146.
197. Lammi C, Bellumori M, Cecchi L, Bartolomei M, Bollati C, Clodoveo ML, ve diğerleri. (2020). Extra Virgin Olive Oil Phenol Extracts Exert Hypocholesterolemic Effects through the Modulation of the LDLR Pathway: In Vitro and Cellular Mechanism of Action Elucidation. *Nutrients*, 12(6), 1723.
198. Tai MH, Chen PK, Chen PY, Wu MJ, Ho CT, Yen JH. (2014). Curcumin enhances cell-surface LDLR level and promotes LDL uptake through downregulation of PCSK9 gene expression in HepG2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(11), 2133-2145.
199. Enayati A, Ghoghnejad M, Roufogalis BD, Maollem SA, Sahebkar A. (2022). Impact of Phytochemicals on PPAR Receptors: Implications for Disease Treatments. *PPAR Research*, 2022(1), 4714914.
200. Sanchez MB, Miranda-Perez E, Verjan JCG, de los Angeles Fortis Barrera M, Perez-Ramos J, Alarcon-Aguilar FJ. (2017). Potential of the chlorogenic acid as multitarget agent: Insulin-secretagogue and PPAR α/γ dual agonist. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 169-175.
201. Ke JY, Kliewer KL, Hamad EM, Cole RM, Powell KA, Andridge RR, ve diğerleri. (2015). The flavonoid, naringenin, decreases adipose tissue mass and attenuates ovariectomy-associated metabolic disturbances in mice. *Nutrition & Metabolism*, 12(1), 1.
202. Feng X, Yu W, Li X, Zhou F, Zhang W, Shen Q, ve diğerleri. (2017). Apigenin, a modulator of PPAR γ , attenuates HFD-induced NAFLD by regulating hepatocyte lipid metabolism and oxidative stress via Nrf2 activation. *Biochemical Pharmacology*, 136, 136-149.
203. Wang M, Xiao FL, Mao YJ, Ying LL, Zhou B, Li Y. (2019). Quercetin decreases the triglyceride content through the PPAR signalling pathway in primary hepatocytes of broiler chickens. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 1000-1010.
204. Cao M, Wang J, Jiang X, Sun Z, Zhao L, Chen G. (2023). Phenolic Constituents from Black Quinoa Alleviate Insulin Resistance in HepG2 Cells via Regulating IRS1/PI3K/Akt/GLUTs Signaling Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(48), 18780-18791.
205. Venkateswaran M, Jayabal S, Hemaiswarya S, Murugesan S, Enkateswara S, Doble M, ve diğerleri. (2021). Polyphenol-rich Indian ginger cultivars ameliorate GLUT4 activity in C2C12 cells, inhibit diabetes-related enzymes and LPS-induced inflammation: An in vitro study. *Journal of Food Biochemistry*, 45(2), e13600.

206. Ayeleso TB, Ramachela K, Mukwevho E. (2018). Aqueous-Methanol Extracts of Orange-Fleshed Sweet Potato (*Ipomoea batatas*) Ameliorate Oxidative Stress and Modulate Type 2 Diabetes Associated Genes in Insulin Resistant C2C12 Cells. *Molecules*, 23(8), 2058.
207. Les F, Arbonés-Mainar JM, Valero MS, López V. (2018). Pomegranate polyphenols and urolithin A inhibit α -glucosidase, dipeptidyl peptidase-4, lipase, triglyceride accumulation and adipogenesis related genes in 3T3-L1 adipocyte-like cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 220, 67-74.
208. Keating E, Martel F. (2018). Antimetabolic Effects of Polyphenols in Breast Cancer Cells: Focus on Glucose Uptake and Metabolism. *Frontiers in Nutrition*, 5, 25.
209. Jacobi D, Liu S, Burkewitz K, Kory N, Knudsen NH, Alexander RK, ve diğerleri. (2015). Hepatic Bmal1 regulates rhythmic mitochondrial dynamics and promotes metabolic fitness. *Cell Metabolism*, 22(4), 709-720.
210. Lee J, Kim MS, Li R, Liu VY, Fu L, Moore DD, ve diğerleri. (2011). Loss of Bmal1 leads to uncoupling and impaired glucose-stimulated insulin secretion in β -cells. *Islets*, 3(6), 381-388.
211. Ye P, Li W, Huang X, Zhao S, Chen W, Xia Y, ve diğerleri. (2022). BMAL1 regulates mitochondrial homeostasis in renal ischaemia-reperfusion injury by mediating the SIRT1/PGC-1 α axis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 26(7), 1994-2009.
212. Lu M, Lan Y, Xiao J, Song M, Chen C, Liang C, ve diğerleri. (2019). Capsaicin Ameliorates the Redox Imbalance and Glucose Metabolism Disorder in an Insulin-Resistance Model via Circadian Clock-Related Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(36), 10089-10096.
213. Tan X, Li L, Wang J, Zhao B, Pan J, Wang L, ve diğerleri. (2019). Resveratrol Prevents Acrylamide-Induced Mitochondrial Dysfunction and Inflammatory Responses via Targeting Circadian Regulator Bmal1 and Cry1 in Hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(31), 8510-8519.
214. Qi G, Mi Y, Fan R, Zhao B, Ren B, Liu X. (2017). Tea polyphenols ameliorates neural redox imbalance and mitochondrial dysfunction via mechanisms linking the key circadian regular Bmal1. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 189-199.
215. Palmeira CM, Teodoro JS, Amorim JA, Steegborn C, Sinclair DA, Rolo AP. (2019). Mitohormesis and metabolic health: The interplay between ROS, cAMP and sirtuins. *Free Radical Biology and Medicine*, 141, 483-491.
216. Machado IF, Miranda RG, Dorta DJ, Rolo AP, Palmeira CM. (2023). Targeting Oxidative Stress with Polyphenols to Fight Liver Diseases. *Antioxidants*, 12(6), 1212.
217. Maradagi T, Kumar R, Ponesakki G. (2022). Hyperglycaemia-induced human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell proliferation through ROS-mediated P38 activation is effectively inhibited by a xanthophyll carotenoid, lutein. *Diabetic Medicine*, 39(2), e14713.
218. Moghadam D, Zarei R, Vakili S, Ghoghji R, Zarezade V, Veisi A, ve diğerleri. (2023). The effect of natural polyphenols Resveratrol, Gallic acid, and Kuromanin chloride on human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in HepG2 hepatocellular carcinoma: role of SIRT1/Nrf2 signaling pathway and oxidative stress. *Molecular Biology Reports*, 50(1), 77-84.
219. Hwang JM, Cho JS, Kim TH, Lee YI. (2010). Ellagic acid protects hepatocytes from damage by inhibiting mitochondrial production of reactive oxygen species. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64(4), 264-270.
220. Wang Y, Qiu Z, Zhou B, Liu C, Ruan J, Yan Q, ve diğerleri. (2015). In vitro antiproliferative and antioxidant effects of urolithin A, the colonic metabolite of ellagic acid, on hepatocellular carcinomas HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 29(5), 1107-1115.
221. Ding X, Jian T, Wu Y, Zuo Y, Li J, Lv H, ve diğerleri. (2019). Ellagic acid ameliorates oxidative stress and insulin resistance in high glucose-treated HepG2 cells via miR-223/keap1-Nrf2 pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 85-94.
222. Abdelkader NF, Elyamany M, Gad AM, Assaf N, Fawzy HM, Elesawy WH. (2020). Ellagic acid attenuates liver toxicity induced by valproic acid in rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 143(1), 23-29.
223. Chen L, Teng H, Cao H. (2019). Chlorogenic acid and caffeic acid from *Sonchus oleraceus* Linn synergistically attenuate insulin resistance and modulate glucose uptake in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 127, 182-187. Erişim 03.04.2025, https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691519301668?casa_token=R1cLJxgwMlgAAA-AA:DUQzXBXia0n7pYGn6NJIbkjCRr2oPJ2rudutIVCGYSyGY2jp--BbKgR7N8vXnivY7vzCYaEls4.
224. Xia T, Duan W, Zhang Z, Fang B, Zhang B, Xu B, ve diğerleri. (2021). Polyphenol-rich extract of Zhenjiang aromatic vinegar ameliorates high glucose-induced insulin resistance by regulating JNK-IRS-1 and PI3K/Akt signaling pathways. *Food Chemistry*, 335, 127513.

225. Huang Q, Chen L, Teng H, Song H, Wu X, Xu M. (2015). Phenolic compounds ameliorate the glucose uptake in HepG2 cells' insulin resistance via activating AMPK: Anti-diabetic effect of phenolic compounds in HepG2 cells. *Journal of Functional Foods*, 19, 487-494.
226. Vilahur G, Padró T, Casaní L, Mendieta G, López JA, Streitenberger S, ve diğerleri. (2015). Polyphenol-enriched Diet Prevents Coronary Endothelial Dysfunction by Activating the Akt/eNOS Pathway. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 68(3), 216-225.
227. Uruno A, Yagishita Y, Yamamoto M. (2015). The Keap1–Nrf2 system and diabetes mellitus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 566, 76-84.
228. Han Y, Zhang Z, Song Q, Sun S, Li W, Yang F, ve diğerleri. (2024). Modulation of glycolipid metabolism in T2DM rats by *Rubus irritans* Focke extract: Insights from metabolic profiling and ERK/IRS-1 signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 332, 118341.
229. Dzah CS, Asante-Donyinah D, Letsyo E, Dzikunoo J, Adams ZS. (2023). Dietary Polyphenols and Obesity: A Review of Polyphenol Effects on Lipid and Glucose Metabolism, Mitochondrial Homeostasis, and Starch Digestibility and Absorption. *Plant Foods for Human Nutrition*, 78(1), 1-12.





