

T.C

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

Urtica dioica L. BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN
EKSTRAKLARLA 3T3-L1 FARE HÜCRE HATTINDA
OBEZİTE ve OBEZİTE KAYNAKLI MEME
KANSERİYLE İLİŞKİLİ *In vitro* ve *In silico* ANALİZLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYLA EREN

ARALIK/2021

T.C

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

Urtica dioica L. BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN
EKSTRAKLARLA 3T3-L1 FARE HÜCRE HATTINDA
OBEZİTE ve OBEZİTE KAYNAKLI MEME
KANSERİYLE İLİŞKİLİ *In vitro* ve *In silico* ANALİZLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYLA EREN

ARALIK/2021

T.C
MUGLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

Ayla EREN tarafından hazırlanan ***Urtica dioica* L. BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKLARLA 3T3-L1 FARE HÜCRE HATTINDA OBEZİTE ve OBEZİTE KAYNAKLI MEME KANSERİYLE İLİŞKİLİ *In vitro* ve *In silico* ANALİZLER** başlıklı tezin 27/12/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JÜRİSİ

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

İmza

Doç. Dr. Mehmet VAROL (**İkinci Danışman**)
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza

Prof. Dr. Reşat ÜNAL (**Üye**)
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza

Prof. Dr. Tuba EDGÜNLÜ (**Üye**)
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza

Dr. Öğretim Üyesi Cengiz AKKALE (**Üye**)
Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Adana

İmza

ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

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

İmza

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

İmza

Doç. Dr. Mehmet VAROL (**İkinci Danışman**)
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza

Savunma Tarihi: 27.12.2021

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

Ayla EREN



ÖZET

***Urtica dioica* L. TIBBİ BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARLA 3T3-L1 FARE HÜCRE HATTINDA OBEZİTE ve OBEZİTE KAYNAKLI MEME KANSERİYLE İLİŞKİLİ *In vitro* ve *In silico* ANALİZLER**

Ayla EREN

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğrt. Üyesi Filiz ALTAN

İkinci Danışman: Doç. Dr. Mehmet VAROL

Aralık 2021, 105 sayfa

Obezite, alınan enerjinin verilen enerjiden fazla olması durumunda vücutta aşırı yağ depolanması ile sonuçlanan ve buna bağlı olarak beraberinde tip 2 diyabet, insülin direnci, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser de dahil olmak üzere birçok kronik hastalık riski ile seyreden sağlık sorunudur. Obezite durumunda oluşan mikroçevredeki değişimler meme kanseri riskini artırmaktadır ve obezitedeki artış meme kanseriyle pozitif bir korelasyon içinde oluşum seyretmektedir. Obezite prevalansı ülkemizde ve dünyada giderek artış göstermekte ve bu durum araştırmacıları alternatif tedavi yolları bulmaya yöneltmektedir. Bu alternatif tedavi yollarını büyük oranda tıbbi bitkiler oluşturmaktadır. *Urtica dioica* L. eski çağlardan beri tıbbi olarak değerli kabul edilen bir bitkidir. Bitkinin içerisinde bulunan etken bileşenler sayesinde anti-inflamatuar ve anti-kanser özelliğinden dolayı literatürde birçok çalışmada yer almaktadır. Bu çalışmada *Urtica dioica*’nın 3T3-L1 adiposit hücrelerine etkisini gözlemlemek amacıyla farklı dozlarda ve farklı saat aralıklarında bitki ekstraktı uygulanan 3T3-L1 adipositler ve LPS ile indüklenen kontrol grupları kullanılmıştır. LPS inflamasyonun artışını tetikleyen bir etken olarak kullanılmıştır. Transkripsiyonel düzeyde regülasyonu incelemek üzere tüm gruplardan RNA elde edilmiş daha sonra RNA’ların cDNA’ya dönüştürülüp meme kanseri, inflamasyon ve obeziteyle bağlantılı olduğu bilinen ve NCBI üzerinden tasarladığımız BRCA-1, BRCA-2, Her-2, TNF- α , IL-6, IL-2, MCP-1, DGAT, Fasn, LPL primerlerinin transkripsiyonel ekspresyonu incelenmiştir. Analiz etmek için qPCR kullanılmıştır ve genlerin ekspresyonunun normalize edilmesi housekeeping gen olan 18S ile sağlanmıştır. Çalışma sonucunda BRCA-1, BRCA-2, LPL, Fasn, MCP-1 ve DGAT-1 genlerinin ekspresyonlarında azalma gözlemlenmiş ve bu değişimler istatistiksel (güven aralığı %95, %99) olarak anlamlı bulunmuştur. Ardından literatürden bitkinin etanolde çözünen etken bileşenleri bulunmuştur. Bu etken bileşenlerin pubchem kullanılarak ligandlar hazırlanmıştır. Anlamlı bulunan genlerin transkripsiyonları PDBQT dosya

formatında kaydedilmiştir. Ligand ve proteinlerin moleküler yerleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Obezite, Meme kanseri, İnflamasyon, *Urtica dioica* L., Moleküler yerleştirme, 3T3-L1 Hücre Hattı



ABSTRACT

***In vitro* and *In silico* ANALYZES RELATED TO OBESITY AND OBESITY-ASSISTED BREAST CANCER IN 3T3-L1 MOUSE CELL LINE WITH EXTRACTS FROM *Urtica dioica* L. MEDICINAL PLANT**

Ayla EREN

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Filiz ALTAN

Co- Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet VAROL

December 2021, 105 pages

Obesity, It is a health problem that results in excessive fat storage in the body if the energy taken is more than the energy given, and accordingly, it is a health problem that progresses with the risk of many chronic diseases, including type 2 diabetes, insulin resistance, cardiovascular diseases and cancer. Changes in the microenvironment in obesity increase the risk of breast cancer, and the increase in obesity is in a positive correlation with breast cancer. The prevalence of obesity is increasing in our country and in the world, and in this case, it leads researchers to find alternative treatment methods. These alternative treatment methods are largely composed of medicinal plants. *Urtica dioica* L. is a plant that has been considered medicinally valuable since ancient times. Thanks to the active components in the plant, it is included in many studies in the literature due to its anti-inflammatory and anti-cancer properties. In this study, 3T3-L1 adipocytes and LPS-induced control groups were used to observe the effect of *Urtica dioica* on 3T3-L1 adipocyte cells. LPS has been used as a factor that triggers increased inflammation. In order to examine the regulation at the transcriptional level, RNA was obtained from all groups, and then the RNAs were converted to cDNA and BRCA-1, BRCA-2, Her-2, TNF- α , IL- 6, Transcriptional expression of IL-2, MCP-1, DGAT-1, Fasn, LPL primers was examined. qPCR was used for analysis and normalization of the expression of the genes provided 18S, the housekeeping gene. As a result of the study, a decrease in the expressions of BRCA-1 BRCA-2, LPL and Fasn, MCP-1, DGAT-1 genes was observed and these changes were found to be statistically significant. Then, the active components of the plant dissolved in ethanol were found from the literature. Ligands were prepared using these active ingredients from Pubchem. The proteins of the genes we found significant were found in PDBQT format. Molecular docking of ligands and proteins was performed.

Keywords: Obesity, Breast cancer, Inflammation, Molecular Docking, *Urtica dioica* L., 3T3-L1 Cell Line

Canım aileme,



ÖNSÖZ

'*Urtica dioica* L. TIBBİ BİTKİSİNDEN ELDE EDİLEN EKSTRAKTLARLA 3T3-L1 FARE HÜCRE HATTINDA OBEZİTE ve OBEZİTE KAYNAKLI MEME KANSERİYLE İLİŞKİLİ *In vitro* ve *In silico* ANALİZLER' adlı bu tez çalışması, 1649B022101546 başvuru nolu **TÜBİTAK BİDEB 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı** ve 21/129/03/1/4 nolu Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini, emeğini ve bilgilerini esirgemeyen ve bana eğitimim boyunca yol gösteren danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Filiz ALTAN'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımnda bana hep destek olan, bilgi ve tecrübesiyle yardımlarını hiç esirgemeyen ikinci danışmanım Doç. Dr. Mehmet VAROL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren Prof. Dr. Reşat ÜNAL hocama çok teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım boyunca bana hep destek olan çalışma arkadaşlarım Hasret KAYA, Hakan KARAKAŞ ve Hilal Büşra TOKGÖZ'e

Moleküler yerleştirme aşamasında bana yardım eden Asya Gülistan ORBAYOĞLU ve Dilhan EVCİMEN'e çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca hep arkamda duran desteklerini benden bir an olsun bile esirgemeyen Eren MÜDERRİSOĞLU'na ve hayatım boyunca hep yanımda olan sevgili annem, babam ve canım kardeşlerim Hakan EREN ve Okan EREN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
SEMBOLLER VE KISALTMA	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç ve Kapsam	1
1.2. Kaynak Özetleri	4
1.2.1. <i>U. dioica</i> L. bitkisi, obezite ve insülin direnci hakkında genel bilgiler	4
1.2.1.1. <i>U. dioica</i> L.....	4
1.2.1.1.1. <i>U. dioica</i> L'nin taksonomik sınıflandırılması	5
1.2.1.1.2. <i>U. dioica</i> L.'nin tıbbi önemi.....	5
1.2.1.2. <i>U. dioica</i> L.'nin biyoaktif bileşenleri.....	7
1.2.2. Obezite, meme kanseri ve inflamasyon	9
1.2.2.1. Obezite	9
1.2.2.2. Meme kanseri.....	13
1.2.2.3. İnflamasyon.....	15
1.2.2.3.1. Obezite ve meme kanserinde inflamasyonun rolü	15
1.2.2.3.2. LPS (Lipopolisakkarit).....	16
1.2.4. Moleküler yerleştirme çalışmaları.....	17
1.2.5. Moleküler markörler olarak seçtiğimiz gen bölgeleriyle ilgili bilgiler	18
2. MATERYAL ve METOT.....	22
2.1. Materyal	22

2.1.1. Bitki materyali.....	22
2.1.2. Hücre hattı.....	22
2.1.3. Kullanılan kimyasallar	22
2.1.3.1. 3T3-L1 hücrelerin büyüüp gelişmesi	22
2.1.3.2. Hücrelerin farklılaşması.....	22
2.1.3.3. İnflamasyonun tetiklenmesi.....	23
2.1.3.4. Oil red O boyama	23
2.1.3.5. RNA İzolasyonu	23
2.1.3.6. cDNA sentezi	23
2.1.3.7. qPCR için gerekli kimyasallar.....	23
2.1.3.8. Primerler	24
2.2. Metot	25
2.1.1. Bitki materyalinin toplanması.....	25
2.2.2. Hücre kültürü çalışması.....	28
2.2.2.1. Hücre çözme işlemi.....	29
2.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması.....	29
2.2.2.3. Hücrelerin dondurulması ve saklanması	30
2.2.2.4. Hücrelerin thoma lamı ile sayımı.....	31
2.2.2.5. Hücrelerin diferansiyasyonu.....	33
2.2.2.6. Oil Red O boyama işlemi	34
2.2.3. 3T3-L1 hücre hattına <i>U. dioica</i> L. ekstraktı konsantrasyon deneme çalışmaları	35
2.2.4. Farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerde bitki üzerine LPS uygulaması	36
2.2.5. Hücrelerden RNA izolasyonu	38
2.2.5.1. Spektrofotometrik analiz.....	39
2.2.5.2. Elektroforetik analiz	39
2.2.6. RNA'dan cDNA sentezi.....	40

2.2.7. Primer dizaynı	41
2.2.8. Kantitatif PCR (qPCR) reaksiyonunun gerçekleştirilmesi.....	43
2.2.9. İstatistiki analiz	44
2.2.10. Moleküler yerleştirme çalışmaları.....	44
2.2.10.1. Ligand yapılarının hazırlanması.....	44
2.2.10.2. Protein yapılarının hazırlanması.....	44
2.2.10.3. Moleküler yerleştirme	45
3.SONUÇLAR ve BULGULAR.....	47
3.1. Hücre Hattıyla İlgili Elde Edilen Gözlemler.....	47
3.1.1. Hücre kültürü çalışmaları.....	47
3.1.1.1. Hücrelerin çözülmesi.....	47
3.1.1.2. Hücrelerin pasajlanması ve dondurulması	48
3.1.1.3. Thoma lamı ile hücrelerin sayımı	49
3.1.1.4. Tripsinasyon aşaması ve pasajlama sonrası hücrelerin görünüşleri	50
3.1.1.5. Hücrelerin diferansiyasyonu.....	52
3.1.2. 3T3-L1 hücre hattına <i>U. dioica</i> L. ekstraktı konsantrasyon deneme çalışmaları sonuçları.....	54
3.1.3. 3T3-L1 hücre hattına LPS ve bitki ekstraktı uygulaması çalışmaları	56
3.1.4. Diferansiye edilen hücelere Oil Red O boyama yapılması.....	59
3.2. RNA İzolasyon Sonuçları	61
3.2.1. Spektrofotometrik analiz sonucu.....	61
3.2.2. Elektroforetik analiz sonucu	62
3.3. Real Time Kantitatif PCR Sonuçları.....	63
3.3.1. qPCR sonrası elde edilen verilerin değerlendirilmesi	63
3.3.1.1. Fasn için elde edilen qPCR analiz sonuçları.....	63
3.3.1.2. LPL geni için elde edilen qPCR analiz sonuçları.....	65
3.3.1.3. DGAT-1 geni için elde edilen qPCR analiz sonuçları.....	67

3.3.1.4. MCP-1 geni için elde edilen qPCR analiz sonuçları.....	69
3.3.1.5. BRCA-1 geni için elde edilen qPCR analiz sonuçları	71
3.3.1.6. BRCA-2 geni için elde edilen qPCR analiz sonuçları	73
3.4. Moleküler Yerleştirme Çalışmaları.....	76
3.4.1. Ligand hazırlama.....	76
3.4.2. Moleküler yerleştirme	82
3.4.2.1. BRCA-1 (1T15) ve Apigenin hexoside etkileşimi	85
3.4.2.2. BRCA-2 (1NOW) ve Apigenin hexoside etkileşimi.....	85
3.4.2.3. FAS (2PX6) ve Quercetin acetyl rutinoside etkileşimi.....	86
3.4.2.4. MCP-1 (1DOK) ve Quercetin acetyl rutinoside etkileşimi.....	87
3.4.2.5. DGAT-1 (6VP0) ve Isorhamnetin rutinoside etkileşimi	87
3.4.2.6. LPL (6E7K) ve Apigenin hexoside etkileşimleri.....	88
3.5. TARTIŞMA	90
4. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	96
KAYNAKÇA	97
ÖZGEÇMİŞ.....	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 <i>U. dioica</i> 'nın taksonomik sınıflandırılması	5
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primerlerin sınıflandırılması ve sekans bilgileri .	24
Çizelge 2.2. cDNA sentezinin ilk adımında yer alan bileşenler	40
Çizelge 2.3. cDNA sentezinin 2. basamağında yer alan bileşenler.....	41
Çizelge 2.4. qPCR reaksiyon protokolü ve olması gereken konsantrasyonlar	43
Çizelge 2.5. qPCR reaksiyonları, sıcaklık ve süreleri.....	43
Çizelge 2.6. Moleküler yerleştirme alan kutusu ve varsayılan grid noktası aralığı ...	45
Çizelge 3.1. RNA konsantrasyonu, RNA saflığı, RNA kontaminasyonu değerleri ..	61
Çizelge 3.2. <i>U. dioica</i> bileşenlerinin ligandlarının pubchem ID numarası ve 2D molekül yapıları	76
Çizelge 3.3. Ligand-protein etkileşimlerine ait yerleştirme enerjileri	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. NF-KB ve STAT-3 gibi sinyal yollarının aktivasyonu.....	11
Şekil 1.2. Autodock programın ön ana yüzü.....	18
Şekil 2.1. <i>U. dioica</i> L. bitkisinin Muğla bölgesinden toplanması.....	25
Şekil 2.2. Bitkinin karanlık ortamda kurutulması	26
Şekil 2.3. <i>U. dioica</i> 'nın ethanolde çözülmesi	26
Şekil 2.4. <i>U. dioica</i> ekstraktının süzgeç kâğıdı yardımı ile balon jojeye aktarılması	27
Şekil 2.5. Evaporatör işlemi ile alkolün uzaklaştırılması.....	28
Şekil 2.6. 3T3-L1 pre-adiposit hücre	28
Şekil 2.7.a. Thoma lamı	31
Şekil 2.7.b. Thoma lamı ile hücre sayımı	32
Şekil 2.8. Hücrelere farklı zaman aralıklarında, 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 200 µg/ml <i>U. dioica</i> ekstraktı uygulanması	35
Şekil 2.9. Farklılaşan hücrelerde bitki üzerine LPS uygulanması	36
Şekil 2.10. NCBI adresinde gen tasarımı	42
Şekil 3.1. Çözünen 3T3-L1 hücrelerin görünümü	47
Şekil 3.2. Hücrelerin pasajlanmadan önceki görünümleri	48
Şekil 3.3. Hücrelerin dondurulması ve saklanması.....	49
Şekil 3.4. Thoma lamı ile hücrelerin sayımı ve ekimi	49
Şekil 3.5. Tripsinazyon sonrası hücrelerin görünümü	50
Şekil 3.6. Santrifüj sonrası hücrelerin pellet halinde görünümü.....	51
Şekil 3.7. Hücrelerin pasajlama sonrası görünümü.....	51
Şekil 3.8. Hücrelerin diferansiyasyon görünümü.....	52
Şekil 3.9. Diferansiye olan hücrelerden bir görünüm (12.gün)	53
Şekil 3.10. Diferansiye olan hücrelerin 20X görünümü	53

Şekil 3.11. 3T3-L1 pre-adiposit hücre hattına 10-20-30 µg/ml dozlarında bitki ekstraktı denemesi.....	55
Şekil 3.12. 3T3-L1 pre-adiposit hücre hattına 40-50-60 µg/ml dozlarında bitki ekstraktı denemesi.....	55
Şekil 3.13. 3T3-L1 pre-adiposit hücre hattına 80-160-240 µg/ml dozlarında bitki ekstraktı denemesi.....	56
Şekil 3.14. Hücrelere LPS ve bitki uygulandıktan sonra hücrelerin 24 saat sonraki görünüşleri.....	57
Şekil 3.15. Hücrelere LPS ve bitki uygulandıktan sonra hücrelerin 48 saat sonraki görünüşleri.....	57
Şekil 3.16. Hücrelere LPS ve bitki uygulandıktan sonra hücrelerin 72 saat sonraki görünüşleri.....	58
Şekil 3.17. Oil Red-O boyama aşaması	59
Şekil 3.18. Oil Red-O ile boyanan hücrelerin görünümü	60
Şekil 3.19. RNA izolasyonu sonrası RNA'ların 3 alt biriminin agaroz jelde görünümü	62
Şekil 3.20. Fasn geninin erime eğrisi grafiği	64
Şekil 3.21. Fasn geninin bağıl mRNA ekspresyonu grafiği.....	65
Şekil 3.22. LPL geninin erime eğrisi grafiği.....	66
Şekil 3.23. LPL geninin bağıl mRNA ekspresyon grafiği	67
Şekil 3.24. DGAT-1 geninin erime eğrisi grafiği	68
Şekil 3.25. DGAT-1 geninin bağıl mRNA ekspresyon grafiği.....	69
Şekil 3.26. MCP-1 geninin erime eğrisi grafiği	70
Şekil 3.27. MCP-1 geninin bağıl mRNA ekspresyonu grafiği	71
Şekil 3.28. BRCA-1 geninin erime eğrisi	72
Şekil 3.29. BRCA-1 geninin bağıl mRNA ekspresyon grafiği	73
Şekil 3.30. BRCA-2 geninin erime eğrisi grafiği.....	74

Şekil 3.31. BRCA-2 bağıl mRNA ekspresyon grafiği.....	75
Şekil 3.32. IL-6 geninin erime eğrisi grafiği.....	75
Şekil 3.33. BRCA-1, BRCA-2, Fasn, MCP-1, DGAT-1 ve LPL proteinlerinin ligand ile eşleşmeleri sonucu aktivasyon değerleri.....	84
Şekil 3.34. Apigenin hexoside'ın BRCA-1 proteini ile etkileşimi	85
Şekil 3.35. Apigenin hexoside'ın BRCA-2 proteini ile etkileşimi	85
Şekil 3.36. Quercetin acetyl rutinoside'ın Fasn proteini ile etkileşimi.....	86
Şekil 3.37. Quercetin acetyl rutinoside'ın MCP-1 proteini ile etkileşimi.....	87
Şekil 3.38. Isorhamnetin rutinoside'ın DGAT-1 proteini ile etkileşimi	87
Şekil 3.39. Apigenin hexoside'ın LPL proteini ile etkileşimi.....	88
Şekil 3.40. LPL, MCP-1, BRCA-1, BRCA-2, Fasn, DGAT-1 primerlerinin DM+LPS'e göre oranlandıklarında (DM+LPS/100) yüzdelik değerleri	89

SEMBOLLER VE KISALTMA

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FCS	Fetal Calf Serum
FBS	Fetal Bovine Serum
GM	Growth Medium
PBS	Phosphate Buffered Saline
rpm	Rapid Per Minute
DMSO	Dimetilsulfoxide
BKİ	Beden Kitle İndeksi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DGAT	Diaçil Gliserol Asetil Transferaz
LPL	Lipoprotein Lipaz
IL-6	İnterlökin-6
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör
FAS	Fatty Acid Synthase
LPS	Lipopolisakkarit
DM	Diferensiyasyon Medium
Brca-1	Meme Kanseri-1
Brca-2	Meme Kanseri-2
Her-2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
Mcp-1	Monocyte Chemoatrac-Actant Protein-1
mL	Mililitre
μ l	Mikrolitre
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik Asit

CO ₂	Karbondioksit
Cdna	Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
�g	Mikro Gram
VLDL	�ok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein



1. GİRİŞ

1.1. Amaç ve Kapsam

Tıbbi bitkiler, tamamlayıcı ve alternatif tıpta önemli bir rol oynamıştır (Fattahi vd., 2013). *Urtica dioica* L. (ısırgan otu) eski çağlardan beri birçok hastalığın tedavisinde kullanılan tıbbi bir bitkidir. *U. dioica* kozmetikte, endüstride ve tıp alanında yaygın kullanıma sahip olup uzun yıllardır halk tarafından da bazı hastalıklar için tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (Colak vd., 2020). Bu hastalıklar ise kardiyovasküler rahatsızlıklar, ateroskleroz, diyabet, romatizma, prostat kanseri, meme kanseri gibi hastalıklardır (Fattahi vd., 2013).

Dünyada giderek artmakta olan obezite, insan sağlığını olumsuz etkilemekte ve beraberinde insanların yaşam kalitesini de düşürmektedir. Obeziteye bağlı hastalıklar, insülin direnci, kardiyovasküler hastalıklar ve kanserde dahil olmak üzere birçok hastalığı tetiklemekte ve bu hastalıklara bağlı olarak ortaya çıkan tıbbi maliyetler dünyada önemli bir sorun haline gelmektedir (Fujita vd., 2019).

Obezite, subkutan (dermis ve kas tabakası arasındaki bölge) ve viseral yağ dokuda bir inflamasyona yol açar ve bu inflamasyon, adipositlerle karakterize olup meme kanseri riskini arttırabilir (Khan vd., 2013). Vücutta fazla olan yağ birikimi hipoksi ve nekroza yol açar, bu da kronik belirti göstermeyen inflamasyonu ve metabolik bozuklukları, ayrıca karsinogenez, tümör progresyonu ve metastaz oluşumundaki değişikliklerde artışa neden olmaktadır (Alim, 2016). Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımlanmasına göre obeziteyi ölçmede genellikle beden kitle indeksi (BKİ) kullanılmaktadır. BKİ, kişinin vücut ağırlığının (kg) kişinin boyunun (m) karesine bölünmesiyle elde edilmektedir. DSÖ'ye göre $BKİ \geq 25$ şişman, $BKİ \geq 30$ 1.derece obez, $BKİ \geq 35$ 2.derece obez ve $BKİ \geq 40$ 3.derece obez olarak sayılmaktadır. Buna bağlı olarak obez kadınlarda meme kanseri riski, normal beden kitle indeksine göre %20 oranında artış gösterdiği tespit edilmiştir (Şimşir vd., 2018).

Yağ dokusu endokrin bir organ olarak işlev gördüğünü ve ana adipositlerin etrafında preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, sinir hücreleri ve makrofajlardan oluşan

heterojen bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Yağ dokusunun fazla olması ile birlikte inflamasyon artmaktadır. Kronik inflamasyon ve kanser arasındaki ilişkiyle birlikte obezite ve kanser arasında gelişen pozitif korelasyonda birçok ortak mekanizmayı ortaya koymaktadır (Şimşir vd., 2018).

Günümüzde cerrahi yaklaşım, kemoterapi ve radyasyon tedavisi şu anda meme kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır, ancak bu tedavi süreçlerinde hastalarda ciddi yan etkiler görülmektedir. Bu durum da araştırmacıları alternatif yollar aramaya yöneltmiştir. Alternatif yollar arasında; doğal kaynak olması, olası yan etkisinin az olması ve maliyetinin düşük olması ve aynı zamanda yaygın tedavi yöntemlerine göre kolay ulaşılabilir olması gibi bazı avantajları nedeniyle şifalı bitkiler kanserin tedavisinde önemli role sahiptir (Fattahi vd., 2013). Bu bağlamda tıbbi bitkilerden elde edilen doğal ürünler, anti-kanser ajanlarının kaynağı olarak değerlendirilmiştir (Moreira vd., 2020). Son yıllarda, *U. dioica* 'nın biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri hakkında gerçekleştirilen çalışmalar ve elde edilen veriler tıbbi bir bitki olarak önemini ortaya koymuştur ve bu da araştırmacıları ülkemizde ve dünyada geleneksel tedavide obeziteden korunmada, kanser tedavisinde tamamlayıcı ve destekleyici olarak *U. dioica* üzerine yoğunlaşmalarını sağlamıştır.

Bu çalışmada tıbbi öneme sahip olan *U. dioica* bitkisi kullanılmıştır. Bitki ile ilgili literatürde meme kanseri, diyabet üzerine bilimsel olarak *in vivo* ve *in vitro* pek çok çalışma olmasına karşın, obezite kaynaklı meme kanseri üzerine bir çalışma mevcut değildir. Obezite nedeniyle kronik inflamasyon meydana gelmekte ve burada oluşan mikroçevrede meme kanseri riskini tetiklemektedir. Bu mikroçevrenin modellenebilmesi amacıyla lipopolisakkarit (LPS) inflamasyonu tetikleyici bir etken olarak kullanılmış ve elde edilen bitki ekstraktlarının oluşan inflamasyonu baskılayıcı etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda, farklılaştırılmış 3T3-L1 adiposit hücrelerine LPS uygulanarak inflamasyon tetiklenmiş ve *U. dioica* ekstraktının farklı konsantrasyon ve farklı saat aralıklarındaki etkileri obezite, meme kanseri ve inflamasyonla ilgili markörler kullanılarak belirlenmiştir. Transkripsiyonel düzeyde regülasyonu incelemek için tüm gruplardan RNA elde edilmiş ve daha sonra RNA'ların cDNA'ya dönüştürülerek obezite ve obezite kaynaklı meme kanseriyle bağlantısı olduğu bilinen ve NCBI üzerinden tasarlanan LPL, Fasn, DGAT-1, MCP-1, BRCA-1, BRCA-2, IL-6, Her-2

primerlerinin transkripsiyonel düzeyde ekspresyonları qPCR analizleri ile incelenmiştir. mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimler 18S housekeeping geni ile normalize edilmiştir. Literatüre dayalı olarak quercetin, p-kumarik asit, ferulik asit, sinapik asit gibi literatüre dayalı olarak bulduğumuz 45 bileşiğin ligandları hazırlanmıştır. Çalışmamız sonucunda istatistiki olarak anlamlı bulduğumuz 6 proteinin pdb formatı alınıp moleküler yerleştirme (docking) işlemi gerçekleştirilmiştir.



1.2. Kaynak Özetleri

1.2.1. *U. dioica* L. bitkisi, obezite ve insülin direnci hakkında genel bilgiler

1.2.1.1. *U. dioica* L. (Isırgan otu)

Bitkiler insanlığın varoluşundan bugüne kadar hayatın temel kaynaklarından biridir. Bitkilerin ürettiği doğal ürünler endüstrinin en temel ürünleri olan primer ve sekonder metabolitleri içermektedir. Bitkiler topraktan aldıkları su, mineral ve bazı bileşenleri kendi metabolizmalarında insan vücudunun özümseyebileceği bileşiklere dönüştürürler. Bu bileşikler, bitki metabolizmasında bulunan etken maddelerdir. Bitki özütlerinin zengin etken madde içeriğinin olması nedeniyle araştırmacıları bu alanda çalışmaya yönlendirmiştir (Gül, 2019). Bu bağlamda tıbbi bitkiler, flavonoidler, fenolik asitler ve fitosteroller gibi biyoaktif bileşiklerin yüksek çeşitliliği ve tüketicilerin doğal gıdalara olan talebi nedeniyle yoğun olarak ilgi görmektedir (Moreira vd., 2020).

Tıbbi öneme sahip bir bitki olan *U. dioica*, *Urticaceae* ailesinden uzun ömürlü yabancı bir bitkidir. Gövdesi ve yaprakları yakıcı tüylerle kaplanmış, çoğunda sütsü öz bulunmayan, tohumlu, basit yapraklı ve yabancı tozlaşma gösteren, küçük çiçeklere sahip, ılıman bölgelerde yetişen bir bitkidir. Aynı bitki üzerinde yaprak koltuklarında meydana gelen çiçekler ya erkek ya da dişidir. Kök ve tohumdan çoğalarak, yavaş yayılım gösterir ve yıl boyunca sürekli olarak bulunur. Bitkinin yakıcı tüyelerine dokunulduğunda asetilkolin, histamin ve 5-hidroksitriptamin (serotonin) salmasından dolayı yakıcı etki gösterir ve adı da buradan gelmektedir (Korkmaz ,2010; Gül, 2019). *U.dioica* 'nın içerisinde yer alan önemli bileşenler ise formik asit, yüksek oranlarda klorofil, flavonoidler, bitki sterolleri, potasyum tuzları, bitki enzimleri, vitamin C, fenilpropanlar, kumarinler, terpenoidler, polisakkaritler, bitki lignanları ve köklerinde küçük molekül ağırlıklı lektin içermektedir (Tello vd., 2008). *U. dioica*, genellikle Kuzey Avrupa, Asya ve Türkiye'de yoğun olarak bulunmaktadır. Kuzey Amerika'da yaygın olarak Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Meksika'da bulunmaktadır. Özellikle yıllık yağışların yüksek olduğu Kuzeybatı Pasifik'te bol miktarda bulunmaktadır (Gül, 2019).

1.2.1.1.1. *U. dioica* L 'nin taksonomik sınıflandırılması

Çizelge 1.1 *U. dioica*'nın taksonomik sınıflandırılması

Alem	Bitkiler
Şube	Kapalı tohumlular
Sınıf	İki çenekliler
Dizi	Gülgiller
Aile	<i>Urticaceae</i>
Tür	<i>U. dioica</i>
Binom adı	<i>U. dioica</i> L.

1.2.1.1.2. *U. dioica* L. 'nin tıbbi önemi

U. dioica L. vücudu güçlendirmek için ayrıca insan tüketiminde yaprakların ürettiği büyük besleyici değerler, çorba ve çeşitli yemeklerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Bitkinin çiçek, yaprak ve tohum gibi kısımları (Joshi vd., 2014) sebze, çay, meyve suyu ve birçok yemekte bileşen olarak kullanılmıştır (Kregiel vd., 2018). Halk sağlığında da kronik hepatit, kolesist, kolanjit ve kabızlık tedavisinde kullanılmaktadır (Joshi vd., 2014). *U. dioica* ilaç, gıda, boya veya kozmetikde yer almakta, egzama, romatizma, artrit, gut ve anemi gibi rahatsızlıklarda ise halk ilacı olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Literatürde bu bitkiden romatizmal eklem deformasyonları, böbrek ve idrar yolları iltihabı, (Kregiel vd., 2018) prostat büyümesi, mide ve bağırsak ülseri, böbrek ve safrakesesi taşı, alerjik rahatsızlıklar, egzama, ergenlik sivilceleri gibi hastalıkların tedavisinde yararlanıldığına dair bilgiler yer almaktadır. Bitki özlerinin, natriüretik ve hipotansif etkileri olduğu kanıtlanmıştır (Orčić vd., 2014). Ayrıca, kök veya yaprakla birlikte hazırlanan kaynama suyuyla baş

yıkandığında, saç dökülmesini durdurduğunu, saçlara parlaklık ve yoğunluk kazandırdığını, kepeklenmeyi engellediği gözlenmiştir (Gül, 2019).

U. dioica'nın antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif, antiallerjenik, antiromatizmal, antikanser, antihiperglisemik, antidiyabet, immünomodülatör, hepatoprotektif, anti-kolit etkileri gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Joshi vd., 2014). *U. dioica*'nın kansere karşı koruyucu etkisi olup, antiproliferatif etkisiyle tümör büyümesini yavaşlatıp kanseri tedavi ettiği belirtilmiştir (Rabia vd., 2019). Literatürdeki bir çalışmada *U. dioica* ekstraktının oksidatif stres ile indüklenen nükleer faktör-kappa B'nin (NF- κ B) aktivasyonunu inhibe ederek bir anti-inflamatuvar etki gösterdiğini belirtmiştir (Erzurum, 2016). *U. dioica*'nın *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada ekstraktın diklorometan özütü ile meme kanseri hücre hattında mRNA seviyesinde transkripsiyonel düzeyde azaltıcı etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Mohammadi vd. 2016). *U. dioica* sebze olarak tüketildiğinde obeziteye karşı koruduğu fareler üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalarla desteklenmiştir (Fan vd. 2020).

U. dioica özleri genik asit, rutin ve izokersitrin gibi bileşiklere sahip olması nedeniyle bitkinin antioksidan, DNA koruyucu, antiinflamatuvar, antihipertansif ve analjezik özellikler için potansiyelini doğrulamaktadır (Akalin vd., 2013; Orčić vd., 2014). *U. dioica*'nın tıbbi bitki olarak kan glukozunu azaltan etkileri gösterilmiştir ve insanlarda ve bazı hayvan çalışmalarında, *U. dioica*'nın kan şekerini ve aşırı pankreas oluşumunu önemli ölçüde azalttığı kanıtlanmıştır (Obanda vd., 2016). *U. dioica*'nın kökleri ve taze yaprakları farklı hastalıklar içinde kullanılmaktadır. Örneğin iyi huylu prostat hiperplazisi için kökler, üriner sistem bozuklukları ve romatizmal hastalıklar için yapraklar kullanılmakta, alerji tedavisinde bitkinin taze dondurularak kurutulmuş yaprakları kullanılmış, özellikle mide, kolon, akciğer, prostat ve meme kanserlerine karşı sitotoksik ve anti-kanser özellikler gösterdiği kanıtlanmıştır (Esposito vd., 2019).

Yapılan bazı çalışmalarda *U. dioica*'nın meme kanseri gibi hormon bağımlı bir kanser olan prostat kanserinin gelişimini geriletmediğini tespit edilmesi araştırmacıları bitkinin meme kanseri üzerindeki etkilerini araştırmaya yöneltmiştir (Tello vd., 2008).

U. dioica ekstraktı kullanılarak yapılan tedavi ile obezitenin neden olduğu insülin direncini azalttığı tespit edilmiştir (Obanda vd. 2016). *U. dioica* ile ilgili literatürde yapılan *in vivo* ve *in vitro* tüm çalışmalar toplu olarak değerlendirildiğinde *U.*

dioica'nın yüksek kapasiteli antioksidan etkisiyle, karsinojenlere karşı koruyucu olduğu, kanser metastazını önlemede, bazı apoptotik yolları indükleyerek, tümörü küçültücü etkileri nedeniyle kanser tedavisinde, kemoterapi ve radyoterapi de destekleyici ve yan etkileri azaltıcı etkileri nedeniyle tamamlayıcı tedavide önemli bir yeri olabileceği düşünülmektedir (Korkmaz, 2010).

2.1.1.2. *U. dioica* L. 'nin biyoaktif bileşenleri

U. dioica önemli sayıda biyolojik olarak aktif bileşenler içermektedir. Örneğin, vitaminler, terpenoidler, karotenoidler ve yağ asitlerinin yanı sıra çeşitli esansiyel amino asitler, klorofil, karbonhidratlar, steroller, tanenler, polisakkaritler, izolektinler ve mineralleri içermektedir (Tello vd., 2008). *U. dioica* 'nın toprak üstü kısımlarından elde edilen özler, zengin polifenol kaynaklarıdır, bitkinin kökleri ise oleanol asit, steroller ve steril glikozitler yer almaktadır (Kregiel vd., 2018). *U. dioica* özütünün güçlü sitotoksik aktivitesi, antibakteriyel, antimutajenik, antioksidan ve antiproliferatif özellikler gibi geniş bir etkiye sahip olan polifenollerinden kaynaklandığını yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Fattahi vd., 2013). Bitkinin yapraklarının uçucu yağlar gibi uçucu bileşikler ve mumlar, pigmentler, bitkisel yağlar ve diğer solütler gibi uçucu olmayan bileşikler içerdiği iyi bilinmektedir (Hojnik vd., 2007; Pinelli vd., 2008). *U. dioica* 'nın kök kısmında naringin, ellagik asit, mirisetin ve rutin gibi ferulik asit ve polifenoller gibi fenol bileşikleri içerdiği bildirilmiştir (Esposito vd., 2019). Kökler ayrıca lignanlar (sekoizolarisinol, 9,90-bisasetil-neo-olivil ve bunların glukozidleri), fitosteroller (örn. Sitosterol), polisakkaritler, izolektinler, kumarinler (örn. Skopoletin), basit fenoller (örneğin, p-hidroksi-benzaldehit), triterpenoid asitler ve monoterpenoidler içermektedir (Yalçın, 2011).

U. dioica yaprak ve saplarının metanolik özütlerinde kersetin-3-O-glukozit, (Fu vd., 2006; Joshi vd., 2014) rutin, ve kaempferol-3-O-glukozit ile birlikte izorhamnetin-3-O-rutinosid bulunmuştur (Esposito vd., 2019). *U. dioica* besleyici değeri yüksek bunun nedeni içerisinde yer alan bileşenler olup, kanı ve tüm vücutu güçlendiren ve bu nedenle tonik ve hafif temizleyici olarak kullanılan iyi bir klorofil, vitamin ve

mineral kaynağı olarak işlev görmektedir (Hojnik vd., 2007). Farmakolojik açıdan, çeşitli asitler ve yağ asitleri, aminler, flavonoidler ve karotenoidler içerirken, alımı için sağlıkta yararlı etkilere sahiptir. Bitki, yemek pişirme, farmasötik ve tıbbi kullanımların yanı sıra, gıdalarda ve ilaçlarda yeşil renklendirici ajan (E140) olarak kullanılan klorofillerin ekstraksiyonu için ticari olarak ihraç edilmektedir (Guil-Guerrero vd., 2003). Fotosentezde başlıca fotoreseptörler olan klorofiller, meyve ve sebzelerin karakteristik yeşil renginden sorumlu olan pigmentlerdir (Koca vd., 2007). Klorofil özleri, mürekkepler, reçineler, kozmetikler, sabunlar, renklendirici ve mumlar, parfümler, yenilebilir yağlar, losyonlar, gargaralar ve derilerde boya olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Hojnik vd., 2007).



1.2.2. Obezite, meme kanseri ve inflamasyon

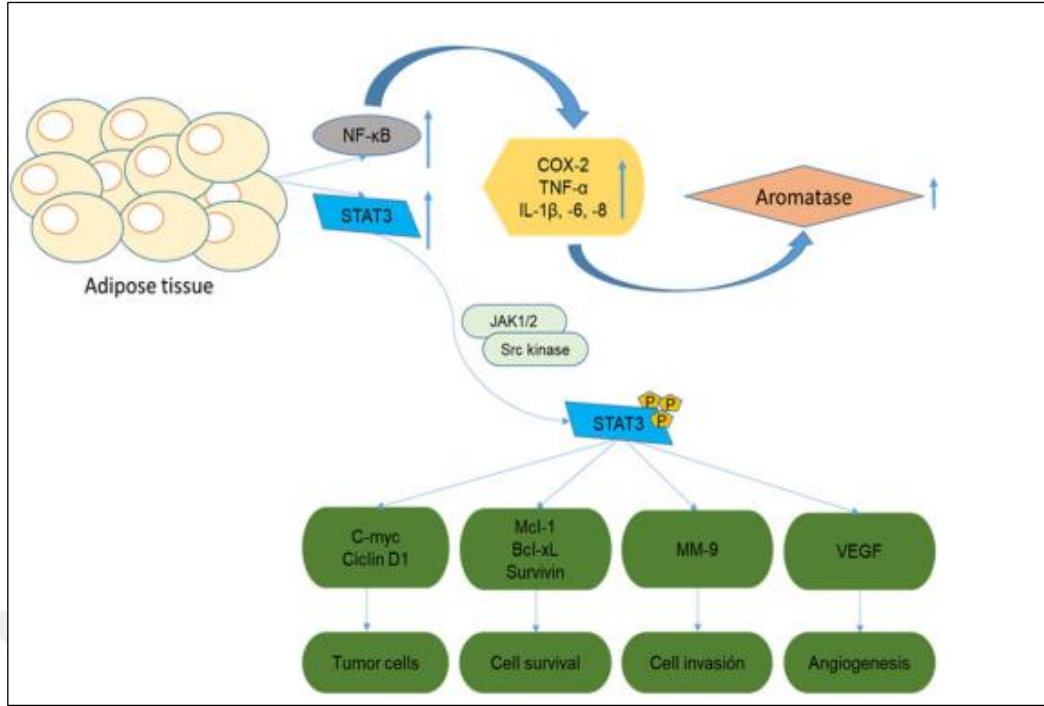
1.2.2.1. Obezite

Obezite genel anlamıyla vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olması durumudur ve vücut yağ oranının, yağsız vücut oranına kıyasla artması ile açıklanan düşük dereceli kronik bir hastalıktır (T.C. Sağlık bakanlığı, 2015). Harcanamayan enerji ise vücutta yağ olarak depolanmakta ve obezite oluşumuna katkı sağlamaktadır. Yağ dokusu fazlalığı olarak da tanımlanan obezite, pek çok sağlık probleminin oluşmasına zemin hazırlamakta ve insan yaşam süresini ve kalitesini de olumsuz etkilemektedir (Şimşir vd., 2018).

Ülkemizde ise kadınların yüzde 20,9'unun obez olduğu görülmektedir. Erkeklerde ise bu oran yüzde 13,7'dir. Toplamda ise Türkiye'de obezite oranı %17'dir (T.C. Sağlık bakanlığı, 2015). Obezitenin en önemli risk faktörleri ise beslenme alışkanlıkları, fiziksel aktivitede azalma, yaş, cinsiyet, evlilik, eğitim düzeyi, doğum sayısı ve genetik oluşturmaktadır. Kalıtsal olarak da geçebilen obezite özellikle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde hızla yayılım göstermektedir (T.C. Sağlık bakanlığı, 2015; Web-1). Obezite, diyabet ve ateroskleroz başta olmak üzere birçok sağlık sorununu tetiklemekte veya bu hastalıkların tedavisini güçleştirmektedir (Crespi vd., 2016). Vücut ağırlığı ve vücut yağ oranının artması, metabolik, endokrin ve immünolojik değişikliklerle karakterize olup, çok sayıda kronik hastalıkla ilişkilidir (Yıldırım, 2018). Çeşitli kanser türleri de bu hastalıklar grubunda yer almaktadır (Yıldırım, 2018). Obezitenin, diyabet ve insülin direnci, kardiyovasküler etkilerine kıyasla kanser ile olan ilişkisi daha az bilinmektedir. Fakat bilimsel veriler vücut yağ oranı artışının bazı kanser türlerinde insidansı ya da kansere bağlı ölüm oranlarını arttırdığını desteklemektedir, çeşitli metabolik hastalıklar ve meme kanserinin de dâhil olduğu birçok kanser türleri ile yakından ilişkilendirilmektedir (Alim, 2016).

Literatürdeki verilerde beden kitle indeksinin her 5 kg/m² artışıyla herhangi bir nedenden kaynaklı mortalitede %30 ve kanser nedeniyle ölümden ise %10 artış olduğu gösterilmiştir (Yıldırım, 2018). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) obeziteyi görülen en

riskli 10 hastalıktan biri olarak kabul etmektedir ve yürütülen son araştırmalarda obezitenin kanserle yakın ilişkisi olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden kilo alımı ve obezite, meme kanseri için potansiyel bir risk oluşturmaktadır. Obezite ile meme kanseri arasındaki ilişkiyi araştıran çeşitli çalışmalar mevcuttur (Şimşir vd., 2018; Tello vd., 2008). Obezite günümüzde inflamatuvar bir sağlık durumu olarak kabul edilmektedir. Obezite ve meme kanseri arasındaki ilişkiyi gösteren hücresel ve moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen obezite ve meme kanser ilişkisi olduğu bilinen sinyal yollarına östrojen, insülin, leptin, adiponektin, inflamatuvar sitokinler ve makrofajların aracılık ettiği ifade edilmektedir (Alim, 2016). Proinflamatuvar sitokinlerde artış (IL -1, IL-6, TNF-a, MCP-1 , CRP, PAI-1) ve makrofajların infiltrasyonunun tetiklenmesi, karsinogenez ile ilişkili genlerin transkripsiyonunun düzeni ve artan metastaz oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (Şimşir vd., 2018). Obezite ile ilişkilendirilen DGAT, yağ asidi sentetaz (FAS) ve LPL, yağ dokusu trigliserit birikiminde önemli olan üç enzimdir. DGAT-1 obezite ve insülin direncinde önemli bir role sahip olduğu söylenebilir, çünkü yağ dokusunda DGAT-1'i aşırı eksprese eden fareler obez duruma gelmektedir (Chen vd., 2002). Trigliserit sentezi için esterlenmemiş yağ asidi substratı sağlayan iki enzim de Fasn ve LPL'dir. Fasn, malonil-CoA, asetil-CoA ve NADPH'den de novo lipogenezi düzenlemektedir ve yağ dokusu, karaciğer ve akciğerde yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir. Obezite durumunda, Fasn, mRNA ve protein seviyelerini arttırır. LPL, yağ dokusu ve kasta yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir. Hem Fasn hemde LPL, obezite durumunda artış göstermektedir (Doolittle vd., 1990; Semenkovich, 1997). Obezite, menopoz sonrası östrojen reseptör pozitif (ER +) meme kanseri için bir risk faktörüdür. Bununla ilgili olarak literatürde yapılmış çalışmalarda, proliferatif tedavi olarak da adlandırılan tedavi yöntemi kronik kas-iskelet sistemi rahatsızlıklarında yıpranmış ya da hasarlı bölgenin yenilenmesini sağlamak amacıyla kullanılan enjeksiyon bazlı tamamlayıcı bir tedavi türü olarak tanımlanabilmektedir. Bu bağlamda östrojenlerin pro-proliferatif etkileri iyi karakterize edilmiştir ve tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığına dair giderek artan sayıda çalışma yapılmaktadır. Daha da önemlisi, obezite yalnızca meme kanseri riskini artırmakla kalmaz, aynı zamanda nüks ve kansere bağlı ölüm riskinde artışına sebep olmaktadır (Bhardwaj vd., 2019).



Şekil 1.1. NF-KB ve STAT-3 gibi sinyal yollarının aktivasyonu (Martinez-Villaluenga vd., 2010)F

Adipokinler beyaz adipöz dokudan adipositler tarafından salgılanan küçük peptit hormonal büyüme faktörleridir. Yağ dokusundan açığa çıkan bu faktörler, nükleer faktör kappa B (NF-KB) ile sinyal iletilişi ve transkripsiyon-3 aktivatörü gibi anahtar inflamatuvar molekülleri (STAT-3) aktive etmektedir (Şekil 1.1.). Obezite ile ilişkili meme kanseri için başlıca etken faktörleridir (Alim, 2016). Adipositlerde oluşan hipertrofi, hiperplazi ve inflamasyon adipöz dokunun yapısında ve adipokinlerin sekresyonunda birçok değişikliğe yol açmaktadır (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2018). Obez ortamda, adipöz doku, sayısı, fenotip ve salgı profilindeki değişiklikler gibi hücresel bileşimin modifikasyonu ile yeniden modellenebilir. Bu değişiklikler obezite ile ilişkili meme kanserinin insidansını ve ilerlemesini etkileyebilir (Howe vd., 2013). Adipöz dokudaki fonksiyonel bozukluklar sistemik metabolizmayı etkileyerek hiperglisemi ve insülin direncine neden olabilir ve ayrıca uzaktaki tümör hücrelerini de etkilemektedir (Howe vd., 2013).

Obezite, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivasyonunu tetikler. Yağ depoları çok fazla bağışıklık hücresi içerir. Yağ dokularındaki makrofajlar, obezlerde

artarak M1-polalize makrofajlara kaymaktadır (S. Khan vd., 2013). Bu makrofajlar proinflamatuvar bir fenotip gösterirler ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinler salgılamaktadır (Saltiel ve Olefsky, 2017). Bu mekanizmaların dışında, obezite kaynaklı meme karsinogenezindeki bir diğer önemli etken, tümör hücreleri ve mikroortam ile olan etkileşimidir. Kemokinler, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi mikroortam moleküllerinde artış gözlemlenmekte bu da tümör prognozunu tetiklemektedir (Mauro vd., 2015). İnterlökin-6 ve leptin, adipoz doku tarafından üretilir ve proanjyogenik olarak görev yapar ve her ikisi de meme kanseri üzerinde inflamatuvar ve mitoz bölünmeyi artırıcı etkiye sahip olduğu yapılan çalışma ile gösterilmiştir (Şahin ve Yardımcı, 2016). Leptin, IL-6, CRP gibi inflamatuvar markerlar, zayıf prognozu (bir hastalığın seyri hakkında iyileşme şansı) olan meme kanseri hastalarında yüksek düzeyde saptanmıştır (Şahin ve Yardımcı, 2016). Obezitede artan ektopik lipoakümülyasyon, doku hipoksisine, inflamasyona ve reaktif anjiyogeneze yol açarak, tümör özelliklerinden metastaz ve invazyon gibi değişikliklere yol açmaktadır (Park vd., 2014). Obezite, hücrel büyüme faktörü sinyal yollarını kronik olarak aktive eder ve neoplastik transformasyon (hücrenin kanserli hücreye dönüşümü) riskini artırmaktadır (Yıldırım, 2018).

1.2.2.2. Meme kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser çeşididir ve dünya genelinde başlıca ölüm nedenlerinden biri olarak, diğer hastalıklar ile kıyaslandığında en ön sıralarda yerini almaktadır. Günümüzde kanser, insanlarda kardiovasküler hastalıktan sonra ikinci önde gelen ölüm nedenidir (Kohler vd., 2015; Mohammadi vd., 2017). Meme kanseri, tüm kadın kanser vakalarının %33'ünü ve kanserden ölümlerin ise %20'sini oluşturmaktadır (Mohammadi Ali vd., 2017), Ek olarak meme kanseri henüz obezite olarak pandemik bir boyut kazanmamış olsa da dünya genelinde kadınlarda en sık görülen kanser türü ve kanser kaynaklı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir (Şimşir vd., 2018). Meme kanseri istatistikleri, ABD'de her sekiz kadından birinin meme kanserine yakalanacağını ve meme kanseri olan 200.000'den fazla yeni hastanın her yıl tanı konulacağını göstermektedir (Kohler vd., 2015). Meme kanseri insidansı yaşla birlikte artış göstermektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2016). Dünya çapında, 2012 yılında 1.7 milyon kadına meme kanseri teşhisi konmuştur. Geçen beş sene içerisinde meme kanseri teşhisi konulan kadınlardan hayatta kalanların sayısı 6.3 milyondur. 2008 yılı tahminlerinden bugüne, meme kanseri görülme sıklığı %20'den fazla artış göstermiş, mortalite (hastalıktan ölüm hızı) ise %14 oranında yükselme göstermiştir (UICC global cancer control, 2015).

Dünya Kanser Araştırma Fonu ve Amerikan Kanser Araştırma Enstitüsü'nün raporlarına göre, vücut yağının meme kanser insidansı ile pozitif korelasyonlu olduğu yönünde tutarlı kanıtlar bulunmaktadır. Ancak, vücutta artmış yağın kanser gelişimi için bir risk faktörü haline gelmesinin biyolojik mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (Alim vd. 2016). Meme, epitel hücrelerin özellikle obezitede yağlı bir ortamda gömülü olduğu spesifik bir organ olduğu için, epitel doku yağ hücreleriyle doğrudan temas halindedir ve bu hücre tipleri arasındaki etkileşimler, yalnızca adipokinleri değil, aynı zamanda yerel proinflamatuvar (inflamasyonu tetikleyici etkenler) mekanizmaları (IL-6, MCP-1, IL-2 gibi) ve hipoksik (beden dokularında oksijen oranının azalması durumu) süreçleri de kapsayan anjiyogenez (damarlanma) ve hücre çoğalmasını stimüle edebilir (Alim, 2016).

Kanserin oluşum mekanizması, türüne göre değişebilmektedir. Ancak temel mekanizmalar insülin rezistansı, obezite, kronik hiperinsülinemi, steroid hormonların artması ve kronik inflamasyondur (şahin ve Yardımcı, 2016). Meme kanseri insidansı gelişmiş ölkelerde gelişmekte olan ölkelere göre daha yüksek olup, ölüm oranları ise daha düşüktür ve buna bağlı olarak genetik ve çevresel faktörler, bireylerin meme kanseri riskini arttırabilmektedir. Kanserde, proliferatif (hücrelerin çoğalmasını destekleyen) bir durumun biyokütle ve enerji taleplerini desteklemek için hücrel metabolizmayı değiştiren onkojenik (normal hücreyi malign hücreye dönüştüren genler) mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (Yıldırım, 2018). Meme kanseri vakalarının sadece %5'ine BRCA-1/BRCA-2 (Meme kanseri yatkınlık/duyarlılık geni) gibi genlerdeki mutasyonlar neden olmaktadır; kalan %95'ine etki eden faktörlerin neden olduğu faktörler geniş ölçüde belirsiz kalmıştır (Alim, 2016).

Oksidatif stres ve yüksek seviyelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS), özellikle yüksek BKM'li (Beden Kitle İndeksi) kadınlarda meme kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir (Marseglia vd., 2015). Ayrıca oksidatif stres, ROS ve reaktif nitrojen türlerinin oluşumu, yüksek seviyelerde leptin, artan östrojen üretimi ve kronik inflamasyon dahil olmak üzere çeşitli obezite ile ilişkili mekanizmalardan kaynaklanabilir ve genel olarak obezite ile ilişkili gelişim için uygun bir mikro ortam yaratmaya katkıda bulunabilir olduğunu göstermektedir (Marseglia vd., 2015).

1.2.2.3. İnflamasyon

1.2.2.3.1. Obezite ve meme kanserinde inflamasyonun rolü

İnflamasyon, vücut bağışıklık sisteminin tahriş edici ajanlara karşı verdiği bir yanıt olarak tanımlanmaktadır. Obezite ve meme kanserindeki ilişkide inflamasyonun rolü oldukça önem arz etmektedir. Tümöre bağlı inflamasyon artık kanserin ayırt edici özelliği olarak kabul edilmektedir (Mantovani vd., 2008). Obezite (vücut kitle indeksi [BMI] 30 kg / m² veya daha fazla) kaynaklı meme dokusunda meydana gelen yağ birikiminin bir sonucu olarak kronik inflamasyon meydana gelmektedir (Crespi vd., 2016). İnflamasyon sonucu oluşan mikroçevre koşullarında meme kanseri riskini tetiklemektedir. Bu yüzden, bu durum araştırmacılara obezite ile kanser arasında neden ve sonuç ilişkisi olduğunu düşündürmektedir. Bu proinflamatuvar faktörler, tümör büyümesi ve ilerlemesi için sinyal iletim görevi görmektedir. Ancak henüz, obezite ve kanser ile ilişkili mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır (Şimşir vd., 2018). Önemli olarak, inflamasyonun kanser hücresinin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu artırdığı, anjiyogenez ve metastatik yayılmayı desteklediği, anti-tümör bağışıklık yanıtlarını bozduğu ve hormonal tedavilere yanıtları değiştirdiği yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Mantovani vd., 2008). Ek olarak obezite durumunda meydana gelen fazla yağ dokusu, büyüme faktörleri, steroid hormonları, proinflamatuvar araçlar ve adipokinlerin kaynağı olan karmaşık bir dizi hücre tipini içermektedir (Babaei vd., 2015; Renehan vd., 2015) ve adipokinler adipoz dokudan salgılanarak adipoz doku, adipozite ile ilişkili kronik inflamasyona başlıca katkıda bulunan etmenler olarak kabul edilmekte ve makrofajların varlığı ile karakterize olmaktadır (Şahin ve Yardımcı, 2016). Fonksiyonel yapısı bozulan adipoz hücreleri, doğrudan inflamasyonu teşvik eden ve monositlerin ve makrofajların aktive olmasını sağlar ve bu sitokinlerin farklılaşmasını indükleyen leptin, C-reaktif protein (CRP), IL-6 ve TNF- α gibi ajanlar bu mikroçevrede artış göstermektedir (Hotamisligil vd., 1993; Howe vd., 2013; Şahin ve Yardımcı, 2016).

Meme kanseri olan obez bireylerde leptin, IL-6 ve C-reaktif protein (CRP) seviyelerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada; obez olanların leptin ve CRP seviyeleri,

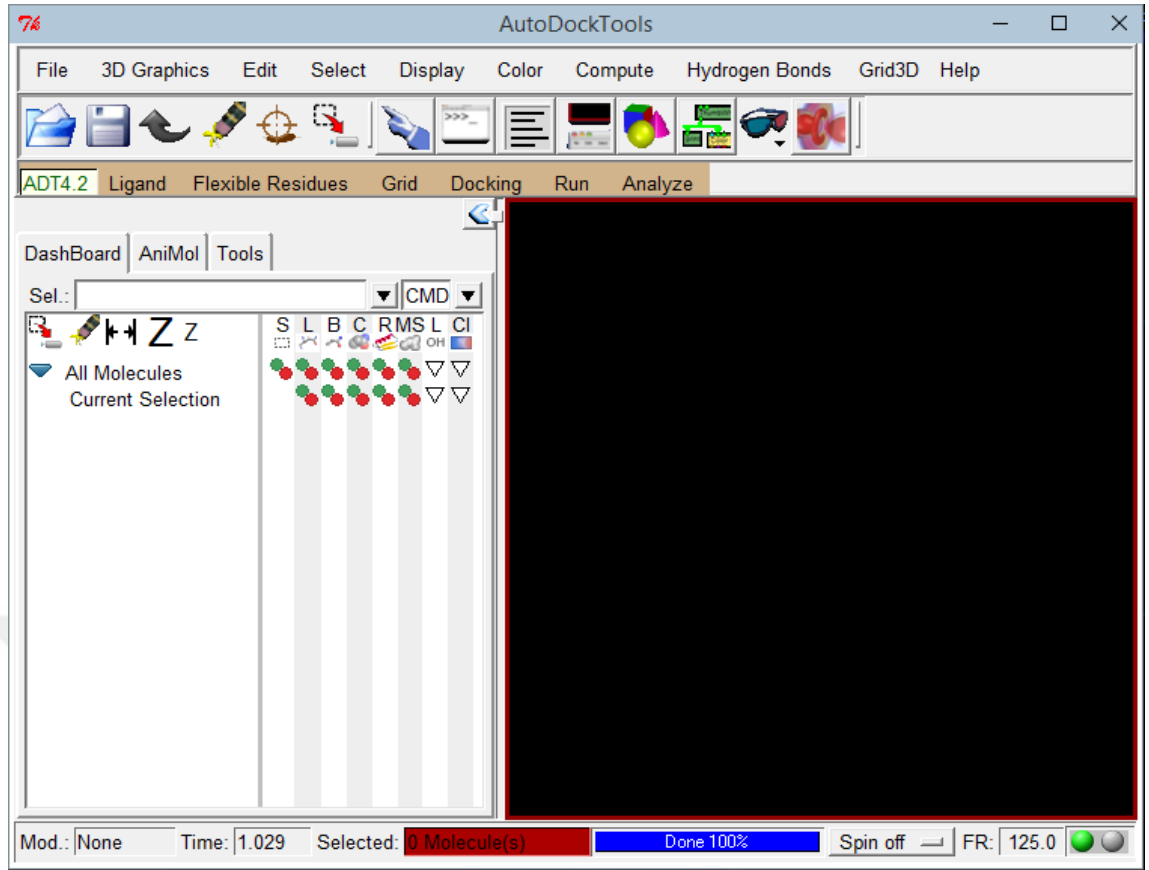
normal ağırlıktaki hastalardan önemli derecede yüksek olup IL-6 seviyelerinde anlamlı fark saptanmamıştır (Babaei vd., 2015). İltihaplanma ve makrofajların meme kanseri risk nüksü (hastalığın tekrar etme durumu) ve prognozunun (hastalığın seyri hakkında öngörü) belirleyicileri olarak oynadıkları role de artan bir ilgi gösterilmiştir (Crespi vd., 2016). İnflamasyon-obezite durumu, terapötik müdahaleler ve potansiyel farmakolojik hedefler için farklı moleküler sinyal yolları sunmaktadır. İnflamasyon ve meme kanserini ilişkilendiren son bulgularla bağlantılı olarak dünya çapında artan obezite oranı, daha fazla araştırmayı teşvik etmektedir (Crespi vd., 2016).

1.2.2.3.2. Lipopolisakkarit (LPS)

Lipopolisakkaritler, sistemik, düşük dereceli inflamasyonun ana nedenlerinden biridir. LPS, gram-negatif bakterilerin dış zarında bulunur ek olarak inflamasyon, obezite, meme kanseri ve metabolik bozukluklar arasında önemli bir bağlantı olarak kabul edilmektedir. LPS inflamasyonu önemli derecede artırıcı etkiye sahiptir. Literatürdeki bir çalışmada LPS ile uyarılan adiposit 3T3-L1 hücrelerinde inflamasyonla ilişkilendirilen proinlamatuvar genler, IL-6, TNF- α ve MCP-1 ekspresyonundaki artışı engellemiştir ve adipositlerde LPS'nin neden olduğu iltihaplanmada rol oynayan ERK1 / 2'nin fosforilasyonu, alliin tedavisinin ardından azalmıştır (Quintero-Fabián vd., 2013). Literatürde yapılan *in vivo* bir çalışmada TNF- α , LPS ile indüklenen karaciğer hasarını arttırmıştır. Adiponektin ile tedavisinden sonra TNF- α 'nın ekspresyonunu azaltarak LPS kaynaklı hasarı iyileştirmiştir (Masaki vd., 2004). Diğer bir *in vivo* çalışmada ise obez bireylere (1mg/ml) LPS uygulanan yağ dokusunda IL-2, IL-8, IL-6 ve TNF- α sitokinlerinin artışı gözlenmiştir (Hoch vd., 2008).

1.2.4. Moleküler yerleştirme çalışmaları

Moleküler yerleştirme (docking) çalışmaları, ligandlar ve proteinlerin etkileşimlerini bilgisayar yazılımları aracılığıyla bir bağlanma modeli oluşturarak analiz edilmesini sağlamak ve uygun eşleşme modellerinin tahmin edilmesine imkan vermektedir (Prieto-Martínez vd., 2018). Moleküler docking sayesinde, enzim-substrat, ilaç-protein, ilaç-nükleik asit, protein-nükleik asit ve protein-protein etkileşimlerini içeren *in silico* analiz verileri; sinyal iletimi, hücre regülasyonu ve diğer makromoleküler etkileşimler gibi birçok biyolojik mekanizmanın anlaşılmasını sağlayabilmektedir (Huang ve Zou, 2010). Protein-ligand docking sistemi, örnekleme ve skorelama olmak üzere iki ana bileşenden meydana gelmektedir. Örnekleme; ligandın, protein üzerindeki bağlantı bölgelerine yakın bölgelere bağlandığı konformasyonların oluşturulması temeline dayanmaktadır. Skorelama ise her bir ligandın bağlanma enerjilerinin olası tahmini üzerine temellenmektedir. En iyi konformasyon olarak, tahmin edilen bağlanma konformasyonları arasından genellikle en düşük bağlanma enerjisi skoruna sahip olan tercih edilmektedir (Huang ve Zou, 2010). AutoDock Programı, moleküler docking çalışmalarında yaygın olarak kullanılan paket programlardan biridir. Substratlar ve aday ilaç yapılarının 3B protein yapısına nasıl bağlandığını tahmin edebilmek amacıyla, The Scripps Research Institute tarafından tasarlanmıştır (Dallakyan, 2013). AutoDock Tools için geliştirilen grafik arayüzü (Şekil 1.2.) ile birlikte ligand üzerindeki dönüşlü bağların, protein yapılarının, bağlanma bölgelerinin görselleştirilmesi sağlanarak kullanıcı dostu bir platform haline getirilmiştir (Dallakyan, 2013). Programa ücretsiz bir şekilde (<http://autodock.scripps.edu/>) adresinden erişilebilmekte ve indirilebilmektedir.



Şekil 1.2. Autodock programının ön ana yüzü

1.2.5. Moleküler markörler olarak seçtiğimiz gen bölgeleriyle ilgili bilgiler

Moleküler markörler, gen veya gen bölgesine ait DNA parçasıdır ve çalışılan organizmada ilgilenilen özelliğin genetiği hakkında bilgi veren DNA dizilerine sahiptir. Obezite ve meme kanseriyle ilgili seçtiğimiz gen bölgelerinin transkripsiyonel regülasyonuna bağlı olarak diferansiye edilmiş 3T3-L1 hücrelerinde *U. dioica* 'nın obezite ve meme kanserine olan etkisi araştırılmıştır. Çalışmada DGAT-1, LPL, Fasn, MCP-1, BRCA-1 BRCA-2, ve housekeeping gen olarak da elde edilen transkripsiyon verilerini normalize etmek amacıyla 18S housekeeping geni kullanılmıştır.

a. Meme kanseri-1 ve meme kanseri-2 (BRCA-1/BRCA-2)

Genç yaşta teşhis konulan kadınlar arasında genetik yatkınlık (BRCA-1 ve BRCA-2 genlerinde görülen mutasyonlar) sonraki meme kanserlerini geliştirmede artan riskin bir kısmına katkıda bulunmaktadır (Society, 2014). Meme kanserine yatkınlık genleri olan BRCA-1 ve BRCA-2 olmak üzere meme kanseri vakalarının %5-%10'u kalıtsal mutasyondan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. BRCA-1 mutasyonu olan kadınların 70 yaşına kadar %44-78'inde ve BRCA-2 mutasyonu olan kadınların ise %31-56'sında meme kanseri gelişebileceği belirtilmektedir (Society, 2014).

b. Diasilgliserol açıl transferaz-1 (DGAT-1)

İnsanlarda DGAT-1 geni tarafından kodlanan bir enzim olarak işlev görmektedir. DGAT-1 geni 17 ekzon içerir ve kromozom 8 üzerinde 10.62 kb'lik bir alana yayılır. Çoğu türde, gen, hesaplanmış moleküler kütlesi ~55 kDa olan yaklaşık 500 amino asitlik bir proteini kodlar. Bu proteinin aktivitesi obezite ve diğer metabolik hastalıklarla ilişkili olabilir (Yen vd., 2008). DGAT-1 obezite ve insülin direncinde önemli olabilir, çünkü yağ dokusunda DGAT-1'i aşırı eksprese eden fareler obez durumundadır ancak insüline dirençli hale gelmemiştir (Smith vd., 2000).

c. Lipoprotein Lipaz (LPL)

VLDL lipoproteinlerdeki trigliseritleri ve şilomikrondaki trigliseritleri serbest yağ asitlerine hidrolizleyen bir enzimdir ve yağ dokusu, kalp kası ve makrofajlar dahil olmak üzere birçok doku tarafından sentezlenebilmektedir. LPL enzimi yağ hücreleri tarafından yağ deposunun oluşması için yapılmaktadır. Normal kilolu bireylerde kilo artışı söz konusu olduğunda LPL aktivitesi artar tam tersi olduğunda ise LPL aktivitesi azalmaktadır. LPL kadında östrojen, erkekte ise testosteron hormonları tarafından kontrol edilir, ayrıca dokuya özel bir şekilde transkripsiyonel transkripsiyon sonrası ve translasyon sonrası seviyelerde düzenlenir (Wang ve Eckel, 2009). Kadınlarda göğüs ve kalçalardaki hücreler LPL üretir. Obezite gelişiminin altında yatan mekanizmalar arasında iskelet kası ve yağ dokusu enzimatik ve reseptör düzenlemesindeki LPL, hormona duyarlı lipaz, çok düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü değişiklikleri içerebilir (Roberts vd., 2002).

d. Yağ asidi sentetaz (Fasn)

Bu enzim birbirinin aynısı iki monomerden oluşan dimerdir. Yağ asidi sentezi insanda temel olarak karaciğerde (ve daha az şekilde meme ve yağ dokusunda) hücre sitoplazmasında gerçekleşir. İnsan vücudunda ise, fazla enerji alımı ve besin tüketimi, yağ dokusunda yağ şeklinde depolanır ve enerji azaldığında yağ asitleri olarak kan akışına salınır. Son zamanlarda, incelenen olup Fasn artan obezite aralığı, vücut yağ dağılımı, insülin duyarlılığı ve glukoz toleransı olan kişilerde metabolik parametrelerle organ ve deri altı yağ dokularında mRNA ekspresyonunda bir artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Schleinitz vd., 2010).

e. Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)

Kemokinler olarak adlandırılan kemotaktik sitokinler, lökosit migrasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Dolaşımdaki kemokin seviyelerinin, obezite ile ilgili patolojiler (örn. Ateroskleroz, diyabet, insülin direnci) dahil olmak üzere inflamatuvar süreçlerde arttığı gösterilmiştir (Kim vd., 2006). Bununla birlikte, şu anda kemokinler ve insan obezitesi arasındaki ilişki hakkında çok az şey bilinmektedir. İlginç bir şekilde, MCP-1, MIP-1 α ve/veya MRP-2'nin gen ekspresyonu ve protein salgılanması arttırmaktadır ve *in vivo* yapılan çalışmada obez hayvanların adiposit ve yağ dokusunda belirgin şekilde artış göstermektedir, sonuç olarak obezite durumunda inflamatuvar ortama katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır (Sartipy ve Loskutoff, 2003).

f. İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2 (HER-2)

HER-2 tirozin kinaz aktivitesine ait, epidermal büyüme faktörü ailesinde yer alan bir onkogendir. Her-2 pozitif meme kanseri bütün meme kanserli hastalarının %25'inde görülür. Bu büyüme faktörünün çoğalması hücre proliferasyonunu artırır ve karsinogeneze yol açan sinyal yollarının aktive olmasını sağlar (Şimşir vd., 2018). İnsülin, IGF-1 ve östrojen, HER-2 / neu tarafından aktive edilen bir sinyal yolu aracılığıyla meme kanseri hücrelerinin pro-liferasyonunu uyarmaktadır (Şimşir vd., 2018).

g. Interlökin-6 (IL-6)

IL-6; asipositler, makrofajlar, iskelet kası, fibroblastlar ve endotel hücreleri de dahil diğer dokular tarafından salgılanan önemli bir sitokindir. IL-6 vücut ağırlığının, lipid metabolizmasının sistemik bir düzenleyicisidir. Ayrıca obezite ve insülin direnci ile ilişkilendirilmektedir (Sindhu vd., 2015). Obezitenin kanser riskini ve gelişimini nasıl arttırdığını anlamak için iki durumda da artış gösteren ve onkojenik transkripsiyon faktörü STAT-3'ün aktivasyonuna neden olan tümör teşvik edici sitokinler IL-6 'nın artan üretimine bağlıdır. Obezite ve artan IL-6 üretiminin neden olduğu kronik yanıtlar diğer kanser risklerini de artırabilir (Park vd., 2014). IL-6'nın düzensiz ve devamlı sentezi kronik inflamasyona ve otoimmün bozukluklara yol açmaktadır (Tanaka vd., 2014).

h. 18S (House keeping gen)

18S, housekeeping gen olarak bilinir ve tipik olarak temel hücresel fonksiyonun korunması için gerekli olan ve normal koşullar altında bir organizmanın tüm hücrelerinde eksprese edilen yapısal genler olarak bilinmektedir. 18S bu çalışmada kullanılan bir housekeeping gendir. Elde edilen veriler 18S ekspresyonu ile kıyaslanarak normalize edilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki materyali

U. dioica L. Muğla bölgesinden toplanmıştır. İlkbahar ve sonbahar aylarında taze oldukları dönemde toplanmış ve Emekli Öğretim Üyesi Prof. Dr. Güven Görk tarafından teşhis edilmiştir.

2.1.2. Hücre hattı

Hücre hattı ATCC firmasından satın alınmıştır (CL-173). Pre-adiposit 3T3-L1 fibroblastik özelliğe sahip *Mus musculus*'un hücre hattı kullanılmıştır.

2.1.3. Kullanılan kimyasallar

2.1.3.1. 3T3-L1 hücrelerin büyüüp gelişmesi

Hücreler büyüme ve gelişme göstermesi için pre-adiposit yapıdayken %10 Fetal Calf Serum (FCS) (Capricorn Scientific, NCS-1B) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) (Multicell,450-201-EL) içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) (L0102-500) besin ortamında kültüre alınmıştır. Bu, hücrelerin büyüme ve gelişme gösterdikleri besin ortamıdır.

2.1.3.2. Hücrelerin farklılaşması

Diferansiyasyon ortamı ise 3T3-L1 pre-adiposit hücrelerin adiposit hücreye dönüşümünde kullanılan besin ortamıdır. Diferansiyasyon ortamında; %10 Fetal Bovine Serum (Capricorn Scientific, FBS-12B) ve %1 Pen-Strep içeren DMEM besin ortamında hazırlanmıştır. Diferansiyasyon ortamına ek olarak 1.0 µM Deksmetazon (Sigma, BCBV5460), 0.5 mM isobütilmetilksantin (IBMX) (Sigma, STBF6061V) ve

1.0 µg/mL insülin (Sigma, SLBV1793) içermektedir. Hücrelerin farklılaşması için 2 gün boyunca bu besin ortamı kullanılmıştır. Ardından hücreler diferansiyasyon mediumun içine 1.0 µg/mL insülin eklenerek bu ortamla yaklaşık 12 gün her iki günde bir ortam değiştirilerek şekilde muamele edilmiştir. Yaklaşık 2 hafta sonunda pre-adiposit yapıdan adiposit yapıya hücrelerin dönüşümü sağlanmıştır.

2.1.3.3. İnflamasyonun tetiklenmesi

Gram negatif bakterilerin dış yüzeyinde bulunan (L5529- 1MG) Sigma markaya ait olan lipopolisakkarit inflamasyonu arttırıcı bir kimyasal olarak kullanılmıştır.

2.1.3.4. Oil red O boyama

Hücrelerin farklılaştığını gözlemlemek amacıyla Oil red O -Bio basic markalı ($C_{26}H_{24}N_4O$) boya kullanılmıştır. Yağ hücreleri kırmızı renkte ve hücrede yer alan çekirdekler ise mavi-mor renkte bir görünüme sahip olmuştur.

2.1.3.5. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu RiboEx™ (301-001) kimyasalı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.1.3.6. cDNA sentezi

İzolasyonu yapılan RNA'ların cDNA'ya çevrilmesinde EasyScript Plus cDNA synthesis kiti (abm, G236) kullanılmıştır.

2.1.3.7. qPCR için gerekli kimyasallar

Elde edilen cDNA örneklerinden primerlerin bağlı mRNA ekspresyonunu belirlemek için qPCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. qPCR reaksiyonunu gerçekleştirmek için Real Q Plus 2X Master Mix (Ampliqon, A323402) kullanılmıştır.

2.1.3.8. Primerler

Çalışmada kullandığımız primerler NCBI üzerinden tasarlanmıştır. Primer dizaynı için (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) adresi kullanılmıştır. Primerler aşağıda 5' - 3' olacak şekilde Forward (F) ve Reverse (R) kısımları verilerek listelenmiştir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan primerlerin sınıflandırılması ve sekans bilgileri

Primer ismi	Primer sekansı (5'-3')	Primerlerin sınıflandırılması
LPL F:	5'-ACTCGCTCTCAGATGCCCTA-3'	Obezite ile ilişkili primerler
LPL R:	5'-TTGTGTTGCTTGCCATTCTC-3'	
DGAT-1 F:	5'-CCTCAGCCTTCTTCCATGAG-3'	
DGAT-1 R:	5'-ACTGGGGCATCGTAGTTGAG-3'	
FASN F:	5'-CTGAGATCCCAGCACTTCTTGA-3'	
FASN R:	5'-GCCTCCGAAGCCAAATGAG-3'	
BRCA-1 F:	5'-TCAGAAGAAGAGCGGATAGAGAC-3'	Meme kanseriyle ilişkili primerler
BRCA-1 R:	5'-ACACAAACTCCGCATCTGTTTAA-3'	
BRCA-2 F:	5'-TCAGTTCCTGAGGATTCACC-3'	
BRCA-2 R:	5'-ACAAAGGTACAGATGGGACTG-3'	
MCP-1 F:	5'-AGGTGTCCCAAAGAAGCTGT-3'	İnflamasyon ile ilişkili primer
MCP-1 R:	5'-AAGACCTTAGGGCAGATGCAG-3'	
18S F	5'- TTCGAACGTCTGCCCTATCAA- 3'	Housekeeping gen
18SR	5'- TAGGTAGGCACGGCGACTA- 3'	

2.2. Metot

2.1.1. Bitki materyalinin toplanması

Yeşil renkli ve yakıcı tüylere sahip *U. dioica* L. Muğla/Köyceğiz bölgesinden toplanmıştır (Şekil 2.1.). Bitkiler serin ve karanlık bir ortamda iki hafta boyunca kurutulmuştur. Kuruyan bitkilerin toprak üstü kısımları öğütülerek toz haline getirilmiştir (Şekil 2.2.).

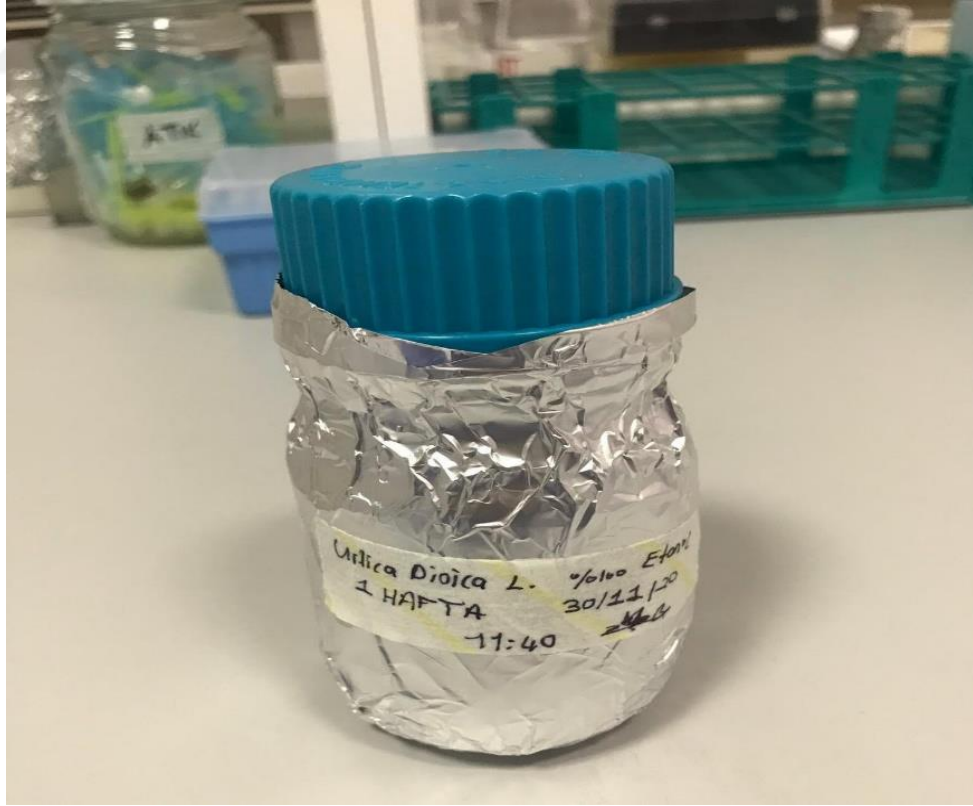
Bitki tozları 10 gr tartılarak otoklav şişelerine aktarılmış üzerlerine 10 katı olacak şekilde 100 ml. Ve %96'lık absolute ethanol çözücüsünün eklendiği bir çözelti oluşturulmuştur (Şekil 2.3.). Bitki içerisinde bulunan kimyasalların ortama salınması için 7 gün boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir.



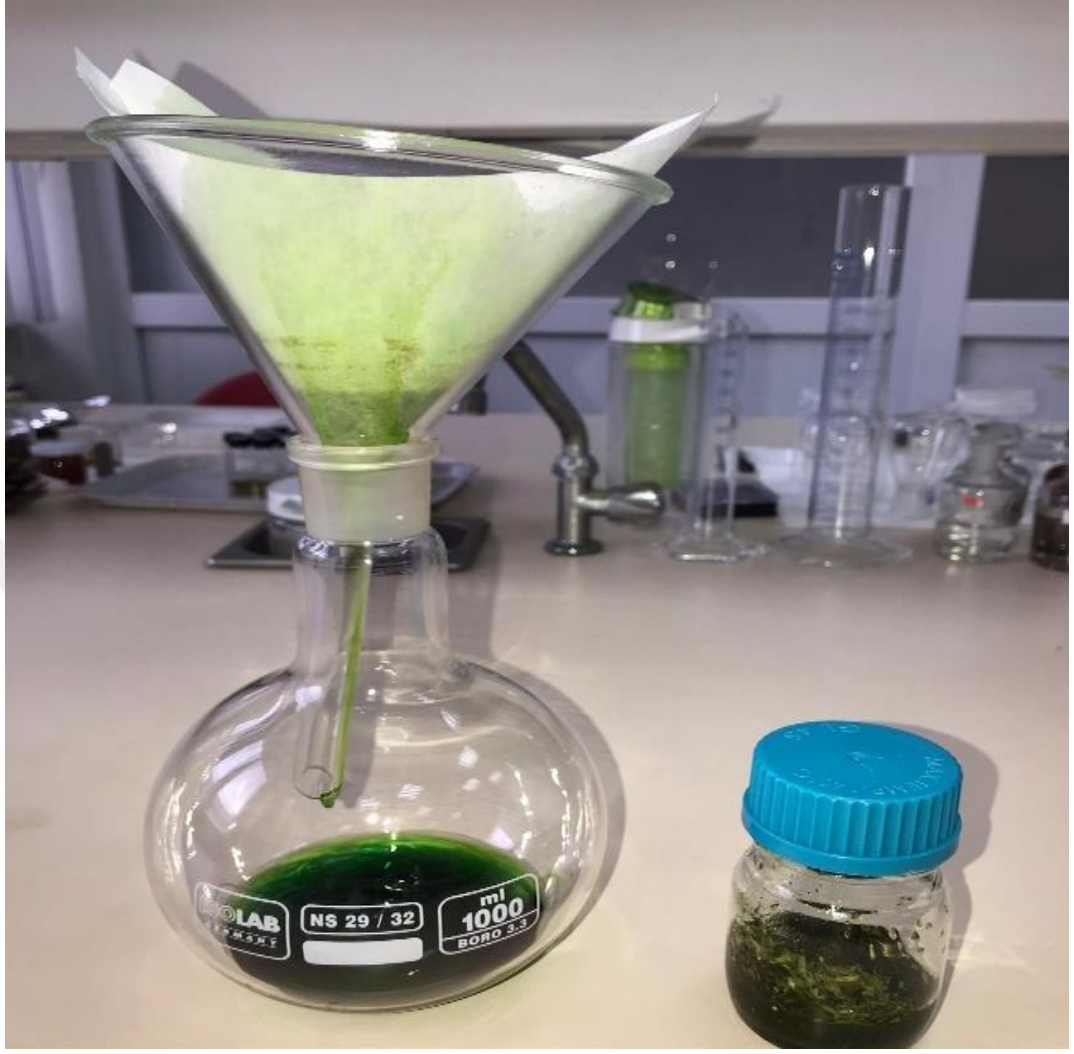
Şekil 2.1. *U. dioica* L. bitkisinin Muğla bölgesinden toplanması



Şekil 2.2. Bitkinin karanlık ortamda kurutulması

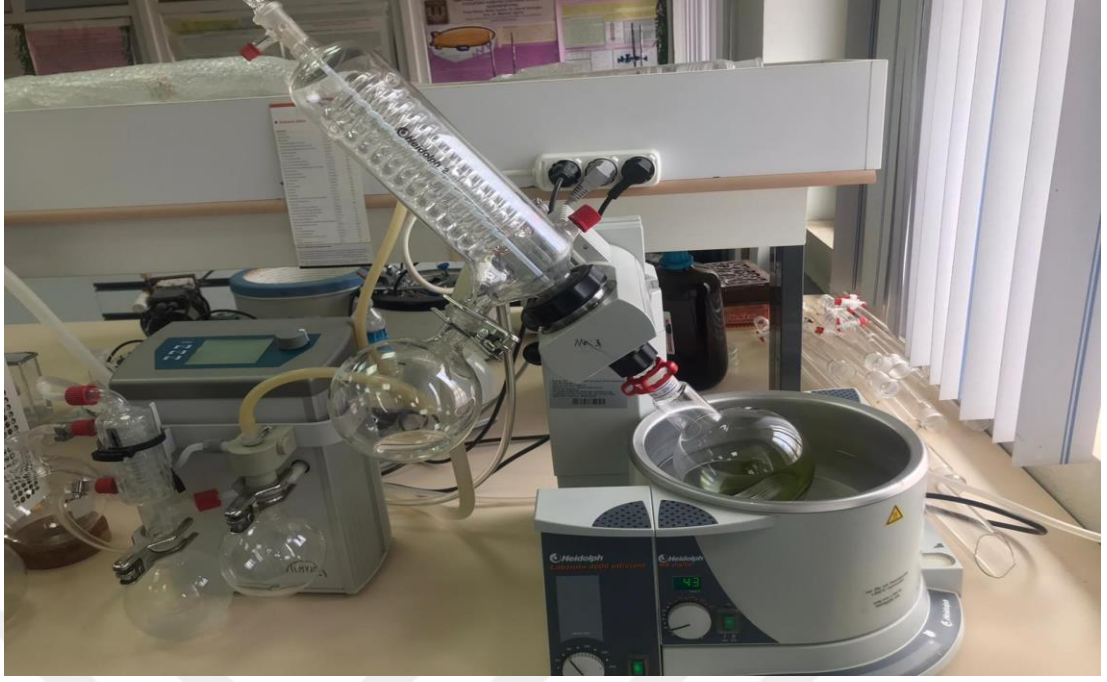


Şekil 2.3. *U. dioica*'nın ethanolde çözülmesi



Şekil 2.4. *U. dioica* ekstraktının süzgeç kâğıdı yardımı ile balon jojeye aktarılması

Bitki ekstraktı 7 gün sonunda süzgeç kâğıdı yardımıyla balon jojeye aktarılmıştır (Şekil 2.4.). Evaporatör sonucunda çözücünün uzaklaştırılması sağlanmıştır (Şekil 2.5). Daha sonra 2 gün çeker ocakta bırakılmıştır. Bu sayede geride kalan çözücünde uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elde edilen ekstraktlar +4 °C’de karanlıkta saklanmıştır.



Şekil 2.5. Evaporatör işlemi ile alkolün uzaklaştırılması

2.2.2. Hücre kültürü çalışması

3T3-L1 pre-adiposit hücre kullanılmıştır. (Şekil 2.6.). Hücrenin pasaj sayısı 10'dur ve -80°C'den alınıp kullanılmıştır.



Şekil 2.6. 3T3-L1 pre-adiposit hücre

2.2.2.1. Hücre çözme işlemi

3T3-L1 hücre hattı kriyovial içerisinde -80°C 'lik buzdolabında ya da -196°C 'de sıvı nitrojende depolanması gerekmektedir. Depolanmış hücreleri tekrar uyandırmak için çözme işlemi yapılmaktadır. Hücreleri çözerken:

1. Growth medium 37°C 'lık su banyosunda 15 veya 20 dakika boyunca bekletilmiştir.
2. Hücre kabini etil alkolle temizlenmiş ve gerekli tüm malzemelerin sterilasyonu sağlanarak kabin içine alınmıştır.
3. 3T3-L1-P10 numaralı hücre ve 25 cm^2 'lik flasklar kullanılmıştır.
4. 15 ml'lik falkon tüplere 4 ml GM eklenmiştir ve onun üstüne kriyovialdeki 1 ml olan hücre eklenmiştir.
5. Hücre ve GM iyice homojenize edildikten sonra 25 cm^2 'lik flasklara aktarılmıştır.
6. Flask üzerine etiketleme yapılarak CO_2 inkübatörüne kaldırılmıştır.

2.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler 10 cm^2 'lik flaskta büyütülmüştür ve pasajlama için 25 cm^2 'lik flasklar kullanılmıştır. Aşağıdaki adımlar izlenerek pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

1. Hücrelerin içinde bulunduğu büyüme ortamı serolojik pipet aracılığıyla uzaklaştırılmıştır.
2. Hücrelerin 3 ml PBS ile 2 kez yıkanması sağlanmıştır. (PBS bir tampon çözeltidir. Hücrelerin büyüme ortamında bulunan FCS'i uzaklaştırarak tripsin enziminin aktivitesini arttırmaktadır. Tripsinizasyon basamağı için ön hazırlıktır).
3. Hücreler 1 ml tripsin ile muamele edilmiştir. Tripsin hücrelerin yüzeyden uzaklaşmasını sağlamaktadır. Bu basamakta hücreler 3 dakika CO_2 inkübatöründe

bekletilmiştir. Yüzeyde görünür hale gelen hücrelerin mekanik etki yardımıyla yüzeyden ayrılması sağlanmıştır.

4. Mikroskop altında yüzeyden ayrıldığı ve bulutumsu bir yapı gösterdiği gözlemlenen hücrelerin tripsin miktarının en az 2 katı kadar hacimde büyüme ortamıyla yıkanması sağlanmıştır.

5. Hücreler serolojik pipet aracılığıyla flasktan 15 ml'lik falcon tüpüne alınmıştır.

6. 1200 rpm'de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Bu adımda hücreler falcon tüpün en altında pellet şeklinde toplanmıştır.

7. Supernatant kısmı serolojik pipet aracılığıyla atılmıştır. Hücre pelleti 1/4 pasajlama için 4 ml'de çözülmüştür.

8. Hücreler çözülürken pelletin partiküllü halde kalmamasına ve homojenizasyonuna dikkat edilmelidir.

9. 4 adet 25 cm²'lik flaskların her her birine 4 ml olacak şekilde önceden ısıtılmış büyüme ortamları ilave edilmiştir.

10. Hücre ve büyüme ortamı karışımı her bir flaska 1 ml olacak şekilde aktarılmıştır.

11. Flasklar dikey ve yatay şekilde yaklaşık 15 dakika boyunca sallanarak hücrelerin tüm kültür kabında eşit dağılması sağlanmıştır.

Hücreleri içeren flask kapları CO₂ inkübatörüne kaldırılmıştır.

2.2.2.3. Hücrelerin dondurulması ve saklanması

Hücrelerin çoğalması durumunda ve bir sonraki deneylerde tekrar kullanılabilmesi açısından hücreler dondurulup saklanabilmektedir.

Hücreler dondurulurken pasajlama prosedürü 6. basamağın sonuna kadar takip edilmiştir. Daha sonra her bir kriyovial için GM: DMSO 9:1 oranında kullanılmıştır. Örneğin 1 kriyovial oluşturmak için $900\ \mu\text{l} \times 1 = 900\ \mu\text{l}$ GM ve hücre karışımı ve $100\ \mu\text{l}$ DMSO kullanılmıştır.

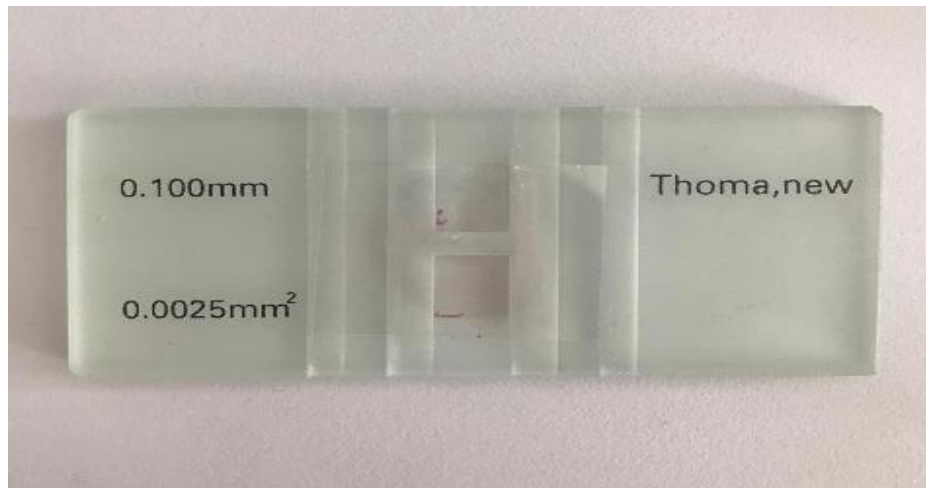
1 kriyovial için toplamda 1 ml kullanılmasının sebebi kullanılan kriyoviallerin hacminin 1 ml olmasıdır. Bununla donma sonucunda hacimdeki artma ile kriyoviallerdeki hücrelere zarar gelmesi engellenmek istenmiştir.

Hücreler önce GM içinde çözülmüştür daha sonra gerekli miktarda DMSO eklenip kriyoviallere aktarılmıştır. Kriyoviallere aktarılan hücreler -80 °C'ye ve -196 °C olan azot tankına kaldırılmıştır.

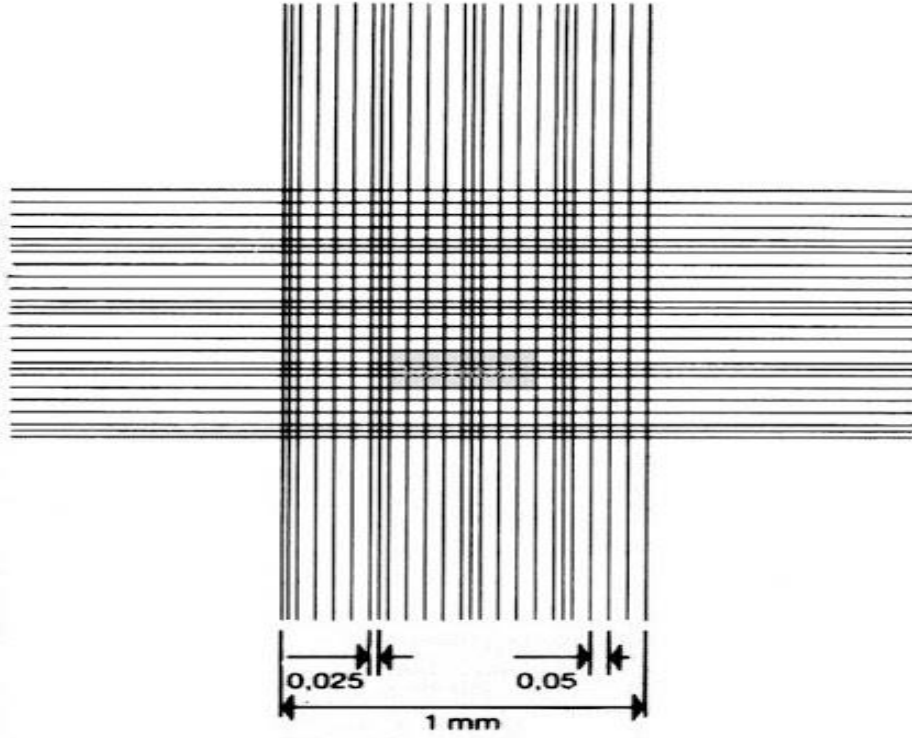
2.2.2.4.Hücrelerin thoma lamı ile sayımı

Thoma lamı ile Sayım:

- Thoma lamının sayma prensibi 0.1 mm^3 alanda yapılan sayımın mL başına düşen mikroorganizma sayısına çevrilmesine dayanmaktadır.
- Thoma lamının üzerinde çukur bir kısım vardır ve bu kısmın üzerinde lamel varken çukurda 0.1 mm yüksekliğinde sıvı kalmaktadır (Web-1).
- Thoma lamının üzerinde bununla beraber çizgilerle belirlenmiş yüzeyler vardır ve 16 büyük kare ve her büyük karede 25 küçük kare olmak üzere toplamda 400 kare bulunmaktadır. Bu kısmın hacmi 0.1 mm^3 'tür (Şekil 2.7.a, 2.7.b.).



Şekil 2.7.a. Thoma lamı



Şekil 2.7.b. Thoma lamı ile hücre sayımı

1. PBS, GM, Tripsin 37 C'lık su banyosuna alınmıştır, 15 dk boyunca ısınması için su banyosunun içinde bekletilmiştir.
2. Thoma lamı açılıp üstü ise etil alkol ile temizlenip lam üstüne direkt olarak yapıştırılmıştır.
3. Flaskın içindeki besiyeri atık kutusuna serolojik pipetle atılmıştır.
4. 2 ml PBS eklenmiştir, bu sayede hücrelerin ön yıkaması sağlanmıştır, bu işlem 2 kez yapılmıştır.
5. 100 μ l Tripsin eklenmiştir, 1dk boyunca CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir. Mekanik etki yaratılarak hücrelerin dağılımı sağlanmıştır.
6. Mikroskop altında incelendikten sonra hücrelerin tek tek ayrıldığı gözlenmiştir.
7. Üstüne 1 ml GM eklenmiştir ve görüntü homojen olana kadar serolojik pipet yardımıyla karıştırılması sağlanmıştır.

8. Thoma lamının bir karesinin kenarından tiple 10 µl aktarılmıştır. Sonra diğer karenin ucundan da 10 µl pipet yardımıyla aktarılmıştır. Sayım işlemi inverted mikroskop altında gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.7.a.).

2.2.2.5. Hücrelerin diferansiyasyonu

Diferansiyasyon işlemi hücrelerin pre-adiposit yapıdan adiposit yapıya dönüştürülmesi için gerçekleştirilmiştir ve aşağıdaki protokol izlenmiştir.

Diferansiyasyon protokolü

Hücreler ekilmiş oldukları kaplarda yaklaşık %70 confluency'e getirilmelidirler.

Yaklaşık %70 confluent olan hücelere ilk olarak pre-diferansiyasyon ortamı uygulanmıştır. Bu ortam DM içinde hazırlanmıştır. DM %1 Penisilin-Streptomisin, %5 Fetal Bovine Serum (FBS) %94 DMEM içerir.

Pre-diferansiyasyon ortamı için:

- a. 1.0 µM Deksametazon
- b. 0.5 mM isobütilmetilksantin (IBMX)
- c. 1.0 µg/mL insülin kullanılmıştır.

Bu ortam içerisinde hücreler 48 saat bekletilmiştir.

24-well plate'den pre-diferansiyasyon ortamı 48 saat sonunda tamamen uzaklaştırılmıştır. Aynı hacimde diferansiyasyon ortamı eklenmiştir. Diferansiyasyon ortamı DM içinde 1.0 µg/mL insülin içermektedir.

Diferansiyasyon ortamı hücrenin durumuna bağlı olarak her 48-72 saatte bir değiştirilmiştir.

Hücreler diferansiye olmaya başladıklarında lipit damlacıkları görünür hale gelmiştir.

Yaklaşık 10-15 gün sonunda hücreler diferansiye olmuştur.

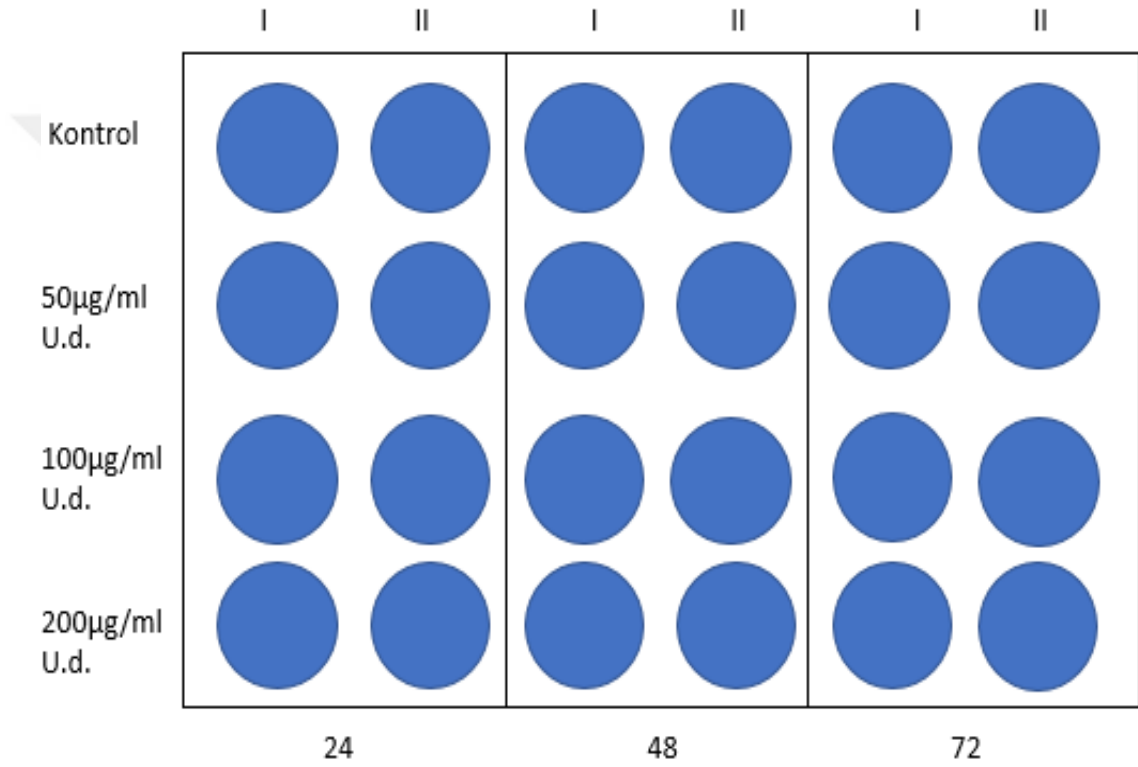
2.2.2.6. Oil Red O boyama işlemi

Tüm bileşenler 24-well plate için 500 µl/well kullanılmıştır.

1. Hücrelerin içinde bulunduğu ortam uzaklaştırılmıştır, 3T3-L1 hücrelerinin ilk aşamada 2 kez PBS ile yıkanması sağlanmıştır (Eğer var ise hücre kalıntıları bu sayede uzaklaştırılmıştır).
2. PBS pipetle çekilip uzaklaştırılmıştır ve hücreler %10'luk formalin ile 60 dakika inkübe edilmesi sağlanmıştır. Formalin hücrelerin fiksasyonu (zemine sabitlenmesi) için kullanılmaktadır. Bu aşamada direkt olarak hücrelerin üzerine pipetleme yapılmamalıdır. Formalinle muamele sonrası inkübasyon homojen karışma sağlanması için karıştırıcıda yapılmıştır.
3. %60'lık izopropanol kültür kaplarına eklenmiştir ve 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir (Pipetle solüsyonları alırken veya çekerken kenardan yapılmalıdır. Direkt 24-well plate'nin üstünden yapılmamalıdır. Hücrelerin kalkmaması ve birbirinin üstüne katlanmaması için dikkatlice bu işlemler gerçekleştirilmedir).
4. Oil Red O çalışma solüsyonu kullanmadan 15 dakika önce hazırlanır. 2X dH₂O ve 3X Oil Red O Stok Solüsyonu iyice karıştırılmıştır ve 10 dakika bekletilmiştir. 0.2 µm şırınga filtresi ile filtreden geçirilerek boya kullanılmıştır.
5. İzopropanol ortamdan uzaklaştırılmıştır ve Oil Red O çalışma solüsyonu ile hücreler muamele edilmiştir.
6. Hücrelerin inkübasyonu 15-20 dakika boyunca karıştırıcıda yapılmıştır.
7. Boya uzaklaştırılmıştır ve 4-5 kere boya görünmeyene kadar dH₂O ile yıkama gerçekleştirilmiştir.
8. Hematoksin eklenmiştir ve 1 dakika inkübe edilmiştir. Hematoksin daha sonra ortamdan uzaklaştırılmıştır ve 4-5 kere daha dH₂O ile yıkanmıştır.
9. Mikroskop altında gözlem yaparken hücreler dH₂O ile kaplı tutulmuştur. Lipit damlacıkları kırmızı ve çekirdekleri ise mavi-mor renkte görülmüştür.

2.2.3. 3T3-L1 hücre hattına *U. dioica* L. ekstraktı konsantrasyon deneme çalışmaları

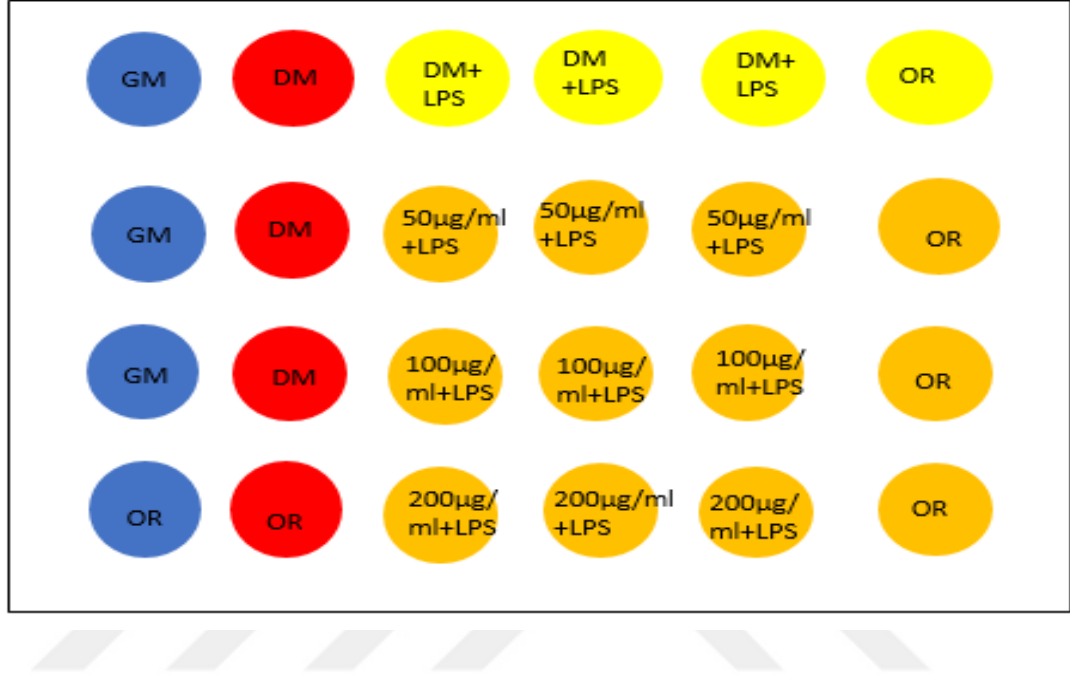
Bitki ekstraktının 3T3-L1 hücrelerine etkisini gözlemlemek üzere 24-well plate’de doza ve zamana bağımlı deney düzeneği kurulmuştur. 24 saat, 48 saat ve 72 saat olmak üzere 3 zaman dilimi kullanılmıştır ve 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml olmak üzere 3 doz ve kontrol grubuyla deney kurulmuştur (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. Hücrelere farklı zaman aralıklarında, 50 µg/ml, 100 µg/ml ve 200 µg/ml *U. dioica* ekstraktı uygulanması

2.2.4. Farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerde bitki üzerine LPS uygulaması

Lipopolisakkarit L6529-1 MG (Escherichia coli O55:B5 Sigma) markası satın alınmıştır.



Şekil 2.9. Farklılaşan hücrelerde bitki üzerine LPS uygulanması

Kuyucuklara Şekil 2.9.'daki gibi gösterilen yerlere LPS uygulanması yapılmıştır ve aşağıdaki protokol izlenmiştir.

1. LPS konsantrasyonu 10 ng/ml olarak kullanılmıştır.
2. 3*24 well plate deney düzeneğine göre hesaplamalar gerçekleştirilmiştir.
3. $3*4*500 \mu\text{l}=6000 \mu\text{l}$ growth medium gereklidir.
4. $3*4*500 \mu\text{l}=6000 \mu\text{l}$ diferansiyasyon medium gereklidir.
5. $3*15*500 \mu\text{l}=22500 \mu\text{l}$ LPS içeren medium gereklidir. Dolayısıyla kullanılacak LPS miktarı 10 ng/ml konsantrasyon için $10*23= 230 \text{ ng}$ ' dır. Dozlar hazırlanırken kayıplar olabileceği için 25 ml LPS içeren medium hazırlamak daha uygundur.

6. LPS içeren medium hazırlanması için aşağıdaki protokol izlenmiştir.
- 6.1 1 mg LPS 1 ml ultra saf su içerisinde çözülür. (1 mg/ml veya 1 µg/ µl). Dikkatlice birkaç kez pipetleme yapılmıştır, tipler plastik materyal olduğu için uzun süre pipetleme işlemi yapılmaz.
 - 6.2 10 dk boyunca vortex uygulanmıştır. Solüsyon ışığa tutularak gözlemlenmiştir; bulanık, sarı rente olması normaldir.
 - 6.3 200 µl olacak şekilde LPS solüsyonu 5 tüpe bölünür ve kullanılmayacak tüpler -20 °C’de saklanmıştır.
 - 6.4 999 µl medium içine 1 µl LPS solüsyonu eklenir ve 1 µg/ml (1 ng/µl) solüsyon elde edilmiştir.
 - 6.5 24.750 µl medium üzerinde 1 ng/µl LPS solüsyonundan 250 µl eklenerek 25 ml 10 ng/ml LPS içeren Diferansiyasyon medium hazırlanmış olur.
7. LPS içeren bu medium hazırlandıktan sonra;
- 7.1 Growth medium verilecek kuyucuklara 500 µl/well olacak şekilde mediumları verilmiştir.
 - 7.2 DM ve OR gruplarına 500 µl/well olacak şekilde Diferansiyasyon medium verilmiştir.
 - 7.3 LPS içeren gruplara 250 µl/well olacak şekilde 10ng/ml LPS içeren diferansiyasyon medium verilmiştir.
 - 7.4 Plakalar 30-60 dakika boyunca 37 °C’de CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir.
 - 7.5 Bu süre zarfında, LPS içeren medium kullanılarak bitki ekstraktının konsantrasyonları hazırlanmıştır. Konsantrasyonlar hazırlanırken 2 katı hesaplanmıştır.
 - 7.6 Her konsantrasyon için 250 µl/well olacak şekilde (4*250=1000 ml) konsantrasyonlar hazırlanmıştır.
 - 7.7 Hazırlanan konsantrasyonlar, 30-60 dakikak inkübasyon sonunda LPS içeren gruplara 250 µl/well olacak şekilde eklenmiştir. Bu kuyucuklarda toplam 500 µl medium hacime tamamlanmıştır.

2.2.5. Hücrelerden RNA izolasyonu

Normal 3T3-L1 hücrelerinden, bitki uygulanmış 3T3-L1 hücrelerinden ve diferansiye edilmiş 3T3-L1 adipositlerinden RiboEx yardımıyla RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RiboEx™'le RNA ekstraksiyonu protokolü aşağıda verilmiştir.

1. 500 ml RiboEx ile hücreler homojenize edilmiştir.
2. Homojenat 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
3. 0,2 ml kloroform eklenmiştir. Sert bir şekilde 25-30 saniye sallanmıştır.
4. Hücreler 12 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
5. 13000 x g'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edilmiştir. Karışım renksiz üst tabaka, renkli interfaz ve alt tabaka olmak üzere 3 kısıma ayrılır ve renksiz üst kısım karışımın %50'sini oluşturur.
6. Supernatant (renksiz üst tabaka) interfaz ve alt tabakaya temas etmeden başka tüpe aktarılmıştır.
7. 0,5 ml %100'lük izopropanol karışıma eklenmiştir.
8. Karışım 3-5 kere aşağı yukarı ters çevirerek nazikçe karıştırılmıştır.
9. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. 13000 xg'de 10 dk süre ile 4°C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilmiştir. Supernatant uzaklaştırılmıştır.
11. 1 ml %75 etanol ile RNA pelleti yıkanmıştır.
12. 8000 xg'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
13. Supernatant atılmıştır ve tüpün kapağı açık şekilde bir gece boyunca (over night) etanolün uçması için bekletilmiştir.
14. RNA, 50 µl ddH₂O'da çözülmüştür ve 30-50 dakika boyunca 56°C sıcaklıkta bekletilmiştir (RNA'lar çözünene kadar su banyosunda inkübasyonu sağlanmıştır). -20°C'de uzun süreli saklanabilir.

Hücrelerden RNA izolasyonu yapılırken ilk olarak hücrelerin içinde bulunduğu ortamın atılması sağlanmıştır. PBS ile iki kez yıkama yapılarak kuyu içinde var ise GM ve DM kalıntıları ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra 24-well plate için her kuyucuğa 500 µl, RiboEx'le hücreler muamele edilmiştir. RiboEx hücrelerin kuyudan kaldırılması için iyice al-ver yapılarak hücreler kaldırılmıştır. Protokolde kullanılan kimyasallar kloroform ve izopropanol RNA'nın çökmesini sağlamak için kullanılmıştır. Etanol ise RNA molekülünün pellet şeklinde çökmesini sağlamak ve tuzları uzaklaştırmak amacıyla kullanılmıştır. RNA molekülü ise sıcaklıktan etkilendiği için ekstraksiyon boyunca +4°C soğutmalı santrifüj kullanılmıştır.

2.2.5.1. Spektrofotometrik analiz

Spektrofotometrik analiz Thermo Scientific µDrop aracılığıyla yapılmıştır. µDrop da 16 tane kuyucuk vardır ve elde edilen RNA'lar her kuyucuğa 3 µl olacak şekilde eklenmiştir ve blank olarak RNA'yı çözdüğümüz ddH₂O kullanılmıştır. Kuyucuklara eklenen örnekler bilgisayar programında da sırayla kaydedilmiştir, cihaz verileri bilgisayar programı aracılığıyla paylaşmaktadır. Ölçüm sonucunda elde edilen 260/280 nm absorbans değerinin 2 veya 2'ye yakın olması RNA'nın saf bir şekilde elde edildiğinin göstergesidir. 260/230 değeri alkol kontaminasyonunu göstermektedir. Konsantrasyon ise cDNA'ya gidilmesi açısından çok önemlidir.

2.2.5.2. Elektroforetik analiz

RNA'nın konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemlerle belirledikten sonra, elektroforetik yöntemle RNA'nın jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

RNA'nın 3 alt birimini (5.8S, 18S, 28S) bant şeklinde görmek için agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

Tüm örnekler %1 agaroz jelde, 60 voltta, 500 amperde 75 dk için RNA jel de yürütülmüştür (PCR tüpünde; 2µl RNA örneği, 2µl boya ve 8 µl ddH₂O kullanılmıştır).

2.2.6. RNA'dan cDNA sentezi

Bu çalışmada cDNA sentezi için One Script Plus Revers Transkriptaz cDNA Sentez kiti kullanılmıştır. Bu reaksiyonu gerçekleştirmek için:

RNA örnekleri ve diğer tüm bileşenler buzda çözölmüştür ve her solüsyonun iyice karışması sağlanmıştır.

Aşağıdaki bileşenlerle reaksiyon başlatılmıştır (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. cDNA sentezinin ilk adımında yer alan bileşenler

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

Karışım 5 dakika boyunca 65°C'ye ısıtılmıştır ve daha sonra buzda 1-2 dakika inkübasyonla soğutulması sağlanmıştır.

Aşağıdaki bileşenler reaksiyon tüpüne eklenmiştir (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. cDNA sentezinin 2. basamağında yer alan bileşenler

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

Bileşenlerin iyice karışması sağlanmıştır ve santrifüjle tüm bileşenler 20 µL son hacimde toplanmıştır.

Tüm 30 dakika 50°C inkübatörde bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

5 dakika boyunca 85°C'ye ısıtılarak reaksiyonun durması sağlanmıştır. Reaksiyon tüpü buz üzerinde soğutulmuştur.

Sentezlenen cDNA reaksiyona ya da sonraki uygulamalar için -20°C'de uzun süreli depolamaya hazır hale getirilmiştir.

2.2.7. Primer dizaynı

Prime tasarımı yapılırken primerlerin yaklaşık 20-24 baz uzunluğunda olması, kendi üstüne katlanmasının minimum seviyede olması ayrıca forward ve revers olarak seçilen primerlerin de birbiriyle birleşme olasılığının en az seviyede olması gerekmektedir. Bu yol izlenerek uygun primer tasarımı yapılmaktadır. Bu çalışmada mRNA'nın ekspresyonu incelendiği için primerler seçilirken 2 ekzonu da kapsayan primerler seçilmiştir. Bu sayede genomik DNA kontaminasyonu en aza indirgenmiştir.

Primerler NCBI'a göre tasarlarırken ilk olarak Gene sekmesinden istenen genin adı yazılmıştır ve *Mus musculus*'a ait genlerin seçilmesi sağlanmıştır. (www.ncbi.nlm.nih.gov) adresinden ilgili gen bulunmuştur (Şekil 2.10).

NCBI Resources How To Sign in to NCBI

Gene Gene Mcp-1 mus musculus Search

Create RSS Save search Advanced Help

Gene sources Genomic

Categories Alternatively spliced Annotated genes Non-coding Protein-coding

Sequence content CCDS Ensembl RefSeq

Status Current Clear all Show additional filters

Tabular 20 per page Sort by Relevance Send to

See *Ccl2* (MCP1) chemokine (C-C motif) ligand 2 in the Gene database.
mcp1 reference sequences Transcript (1) Protein (1)

Filters: Manage Filters

Find related data Database: Select Find items

Search results Items: 1 to 20 of 149

See also 1 discontinued or replaced items.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
☐ <i>Ccl2</i> ID: 20296	chemokine (C-C motif) ligand 2 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 11, NC_000077.7 (81926403..81928278)	AI323594, HC11, JE, MCA, MCAF, MCP, MCP-, MCP-1, MCP1, SMC-C, SMC-CF, Scy, Scya2, Sig, Stola
☐ <i>Ccr2</i> ID: 12772	chemokine (C-C motif) receptor 2 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 5, NC_000075.7 (123901954..123913594)	CC-CKR-, CCR, CKR, Cc-ckr-2a, Ccr2b, Ckr2, Ckr2a, Ckr2b, Cmkbr, Cmkbr2, mJe-r, Ccr2
☐ <i>Mcp1</i> ID: 17224	mast cell protease 1 [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 14, NC_000080.7 (56255421..56257848)	AV080368, Mcp-, Mcp-1
☐ <i>Zc3h12a</i> ID: 230738	zinc finger CCCH type containing 12A [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 4, NC_000070.7 (125012207..125021674, complement)	BC036563, MCPIP, MCPIP-1, Mcp, Mcpip1, Reg1
☐ <i>ApoE</i> ID: 11816	apolipoprotein E [<i>Mus musculus</i> (house mouse)]	Chromosome 7, NC_000073.7 (19430169..19434326, complement)	A, AI255918, Apo-E

Search details

Mcp-1[All Fields] AND ("Mus musculus" [Organism] OR mus musculus[All Fields])) AND alive[prop]

Search See more...

Recent activity Turn Off Clear

Mcp-1 mus musculus AND (alive[prop]) (149) Gene

MCP-1 mus musculus AND (alive[prop]) (149) Gene

HER-2 mus musculus AND (alive[prop]) (31)

Şekil 2.10. NCBI adresinde gen tasarımı

Daha sonra RefSeq RNA sekmesinin seçilmesi sağlanarak, mRNA'ya göre primer tasarlamak için Pic Primers sekmesine tıklanmıştır.

Farklı primer çiftleri arasından seçim yaparken forward ve reverse primerlerin Tm derecelerinin yakın olması önemlidir çünkü seçilen genlerde, kendi üzerine katlanmasının ve primer dimeri oluşturma olasılığının en aza indirgenmesi gerektiği için primer seçerken dikkat edilmelidir (Şekil 2.10.).

2.2.8. Kantitatif PCR (qPCR) reaksiyonunun gerçekleştirilmesi

qPCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek üzere Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix Green kullanılmıştır. Reaksiyon aşağıdaki konsantrasyonlarda bileşenler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.4.)

Çizelge 2.4. qPCR reaksiyon protokolü ve olması gereken konsantrasyonlar

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
cDNA (~ 150 ng/μL)	1,5 μL	~ 15 ng/μL
Ampliqon RealQ Plus 2x Master Mix	5 μL	1X
Primer-Forward (10pmol/ μL)	0,5 μL	0,5 pmol/ μL
Primer Revers (10 pmol/ μL)	0,5 μL	0,5 pmol/ / μL
ddH ₂ O	2,5 μL	-

Aşağıda verilen çizelgede PCR cihazında programlama yapılarak qPCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. qPCR reaksiyonları, sıcaklık ve süreleri

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

2.2.9. İstatistiki analiz

İstatistiki analiz yapılırken ttest kullanılmıştır ve ttest örneklerin analizi, istatistiki olarak anlamlı olup olmadığını belirler. Tetsti değeri <0,05 altında olanlar anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

2.2.10. Moleküler yerleştirme çalışmaları

2.2.10.1. Ligand yapılarının hazırlanması

Literatüre dayalı olarak tespit edilen *U. dioica* L. tıbbi bitkisine ait ligandların (bileşiklerin) 2D kimyasal yapıları ChemDraw 18.0 kullanılarak hazırlanmıştır. Ligandların geometrik ve elektronik yapıları, Yoğunluk Fonksiyonel Teorisine (DFT) dayalı *ab-initio* kuantum mekanik hesaplamalar kullanılarak B3LYP/3-21G seviyesinde Hartree-Fock (HF) teorisine sahip Gaussian 03 yazılımı kullanılarak optimize edilmiştir. Ligandların görüntülenmesi için Chem3D 18.0 kullanılmış ve ligandlar Mol2 dosya formatında kaydedilmiştir. Mol2 dosyaları daha sonra, gasteiger yükleri eklenerek, polar olmayan hidrojenleri birleştirilerek, aromatik karbonları ve döndürülebilir bağları tespit edilerek ve TORSDOF değerleri ayarlanarak Autodock Tools sürüm 1.5.6 yardımıyla PDBQT (Protein Data Bank (PDB), Partial Charge (Q) & Atom Type (T)) dosya formatına dönüştürülmüş ve bir kütüphane hazırlanmıştır (Kumar ve Bora, 2014).

2.2.10.2. Protein yapılarının hazırlanması

Ekspresyon seviyeleri incelen genler tarafından ürettirilen BRCA-1 (PDB ID: 1T15), BRCA-2 (PDB ID: 1N0W), Fasn (PDB ID: 2PX6), MCP-1 (PDB ID: 1DOK), DGAT-1 (PDB ID: 6VP0) ve LPL (PDB ID: 6E7K) proteinlerinin üç boyutlu yapıları protein veri bankasından (PDB; <https://www.rcsb.org/>) pdb formatında elde edilmiştir. Protein yapıları, Autodock Tools sürüm 1.5.6'da görüntülenmiş, hetero-atomlar, su molekülleri, ligand grupları ve nükleik asit grupları çıkarılmıştır. Autodock Tools

sürüm 1.5.6 kullanılarak, polar hidrojenler eklenmiş ve polar olmayan hidrojenler birleştirilmiştir. Kayıp atomlar, Kollman yükleri atanmadan ve kalıntılardaki tüm atomların üzerindeki yük açığı dağıtılmadan önce kontrol edilmiş ve düzenlenmiştir (Kumar ve Bora, 2014; Morris vd., 1998). Protein yapıları sonraki uygulamalar için PDBQT dosya formatında kaydedilmiştir (Kumar ve Bora, 2014).

2.2.10.3. Moleküler yerleştirme

PDBQT formatında kaydedilen proteinler üzerine ligandların moleküler yerleştirme çalışmaları, AutoDock Vina süite (Trott ve Olson, 2010) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Windows 10 Home işletim sisteminde, AutoDock Vina'yı başlatmak için DWIM Perl arayüzü kullanılmıştır. Bağlanma yeri koordinatları, proteinler üzerinde yer alan ligandların konumu dikkate alınarak belirlenmiştir (Çizelge 2.6.). AutoDock Vina, Genetik Algoritma (GA-LS) aramalarını kullanarak her bir yerleştirme için yirmi olası bağlanma biçimi oluşturmuştur. Arama alanını belirlemek için kullanılan yerleştirme alan kutusu, varsayılan grid noktası aralığı ile önceden belirlenmiş koordinatlar kullanılarak ayarlanmıştır (Çizelge 2.6.). Moleküler yerleştirme işlemi tamamlandıktan sonra, en düşük yerleştirme enerjisine (kcal/mol) göre en uygun pozisyonlar belirlenmiştir. Seçilen konformasyonlar ve protein yapısı birleştirilmiş, Pymol yazılımı kullanılarak incelenmiş, ekran görüntüleri alınarak etkileşimler figürler halinde düzenlenmiştir.

Çizelge 2.6. Moleküler yerleştirme alan kutusu ve varsayılan grid noktası aralığı

Proteinler	PDB ID	Koordinatlar	Yerleştirme Kutusu
BRCA1 (BRCT Domainin Kristal Yapısı)	1T15	X= -7,73 Y= 24,32 Z= 38,68	30x30x30 Å
BRCA2 RAD51-BRCA2 BRC tekrar kompleksinin kristal yapısı	1N0W	X= 32,15 Y= 22,98 Z= 0,753	30x30x30 Å

Çizelge 2.6. (devam)

FAS İnsan yağ asidi sentazının tiyoesteraz bölgesinin kristal yapısı	2PX6	X= -1,99 Y= -5,83 Z= 15,34	40x40x40 Å
MCP-1 Monosit Kemoatraktan Protein 1, P-Formu	1DOK	X= 21,84 Y= 39,12 Z= 34,91	30x30x30 Å
DGAT-1 İnsan Diasilgliserol Asiltransferaz 1	6VP0	X= 111,3 Y= 111,4 Z= 107,5	60x60x60 Å
LPL Plazma trigliserit hidrolizine aracılık eden lipoprotein lipaz GPIHBP1 kompleksinin yapısı	6E7K	X= 16,53 Y= 16,41 Z= 3,496	60x60x60 Å

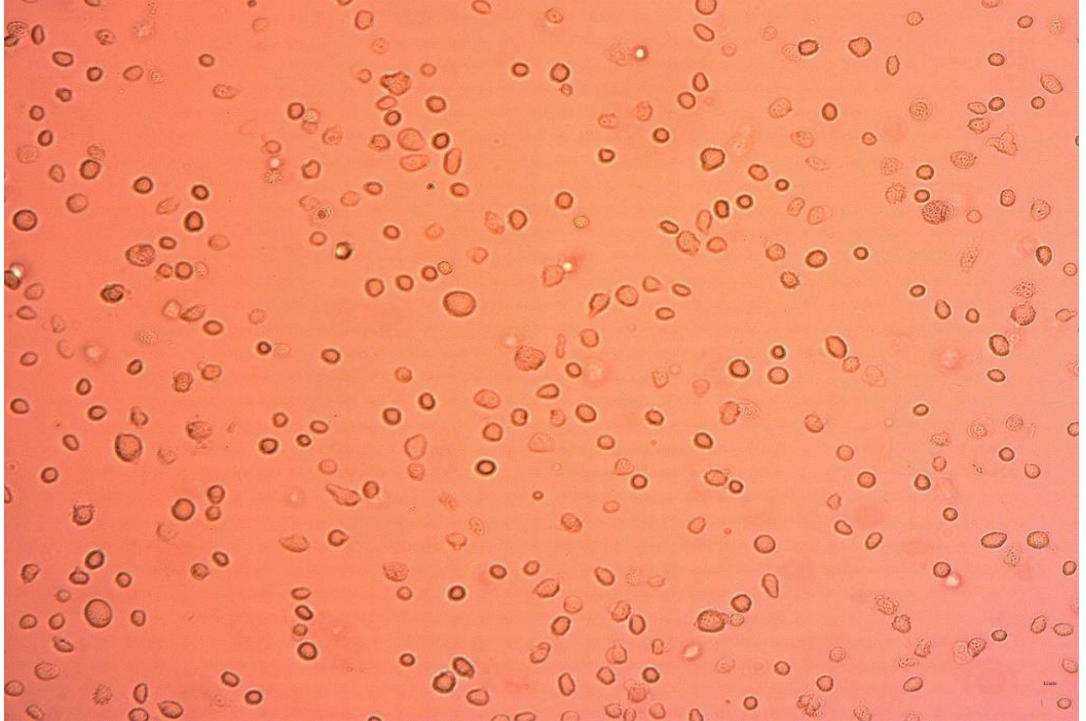
3.SONUÇLAR ve BULGULAR

3.1. Hücre Hattıyla İlgili Elde Edilen Gözlemler

3.1.1. Hücre kültürü çalışmaları

3.1.1.1. Hücrelerin çözülmesi

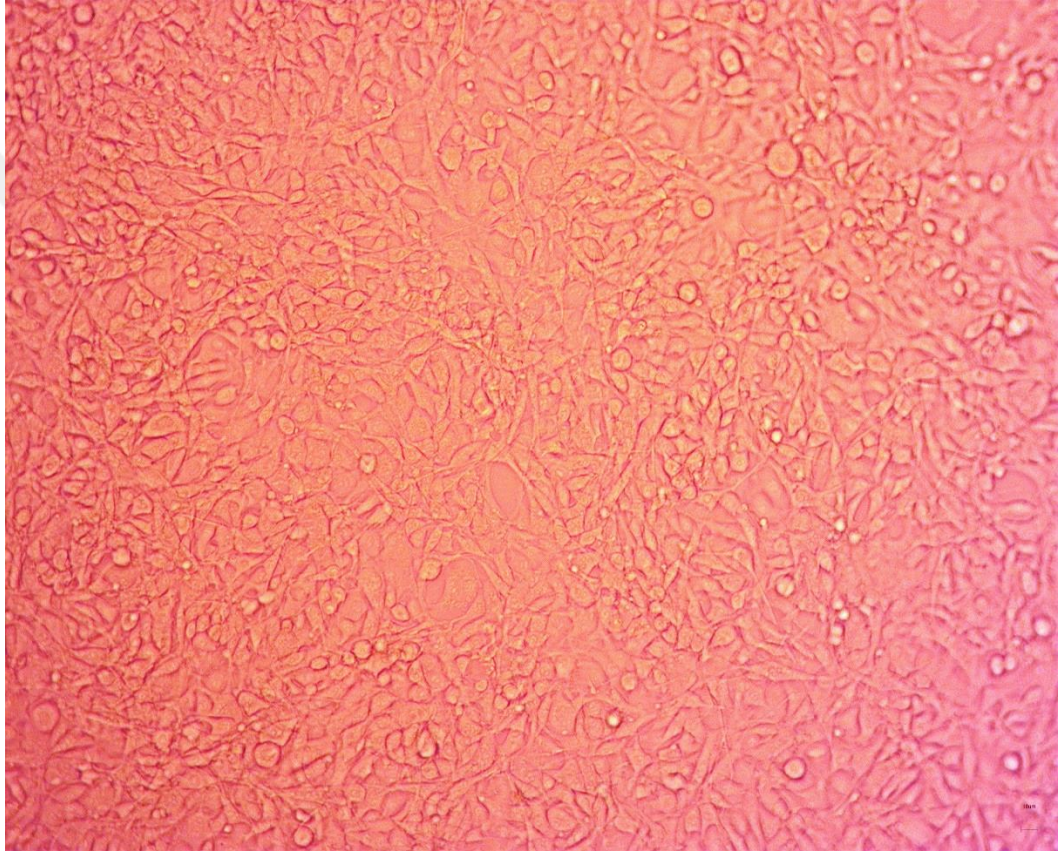
Hücreler -80°C'den alınıp çözülmüştür. Çözünen hücrelerin görünümü gösterilmiştir (Şekil 3.1.). Hücreler dondurulurken toksik bir kimyasal olan dimetilsüfoksitin (DMSO) su tutucu özelliğinden yararlanılmıştır. Hücreler çözüldüğünde DMSO içeren ortamıyla beraber besin ortamına aktarıldığı için DMSO'lu besiyerinin 24 saat sonra ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Hücreler yeni çözüldüğünde fibroblastik yapıya sahip değildir. Hücreler birbiriyle henüz etkileşim içinde olmadığından şekilleri yuvarlaktır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Çözünen 3T3-L1 hücrelerin görünümü

3.1.1.2. Hücreslerin pasajlanması ve dondurulması

Hücresler, flaskın tüm alanını kapladığında alt kültür edilmesi gerekmektedir. Çünkü flask tabanına yapışık halde bulunan hücreler, hücre yoğunluğu arttıkça tek tabakalı yapıdan çok tabakalı yapıya geçecektir ve hücreler üst üste gelip tabandan kalkacaktır. Bu durum hücrelerin sağlıklı bir biçimde büyümesine ve tabandan kalkmasına sebep olacaktır. Hücrelerin pasajlanmadan önceki görüntüsü (Şekil 3.2.) gösterilmiştir.



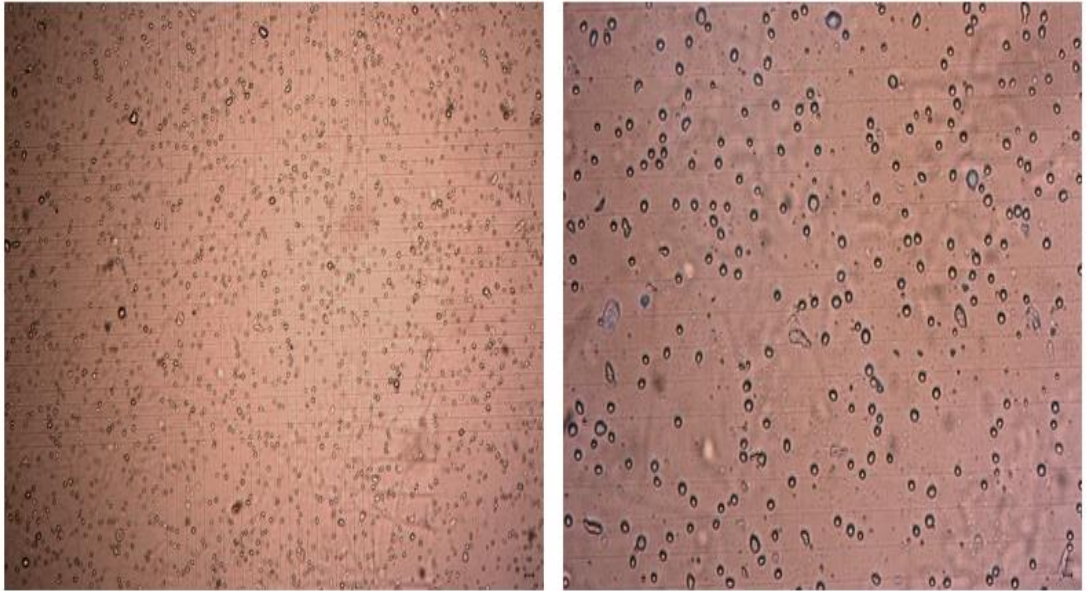
Şekil 3.2. Hücrelerin pasajlanmadan önceki görüntüleri



Şekil 3.3. Hücrelerin dondurulması ve saklanması

3.1.1.3. Thoma lamı ile hücrelerin sayımı

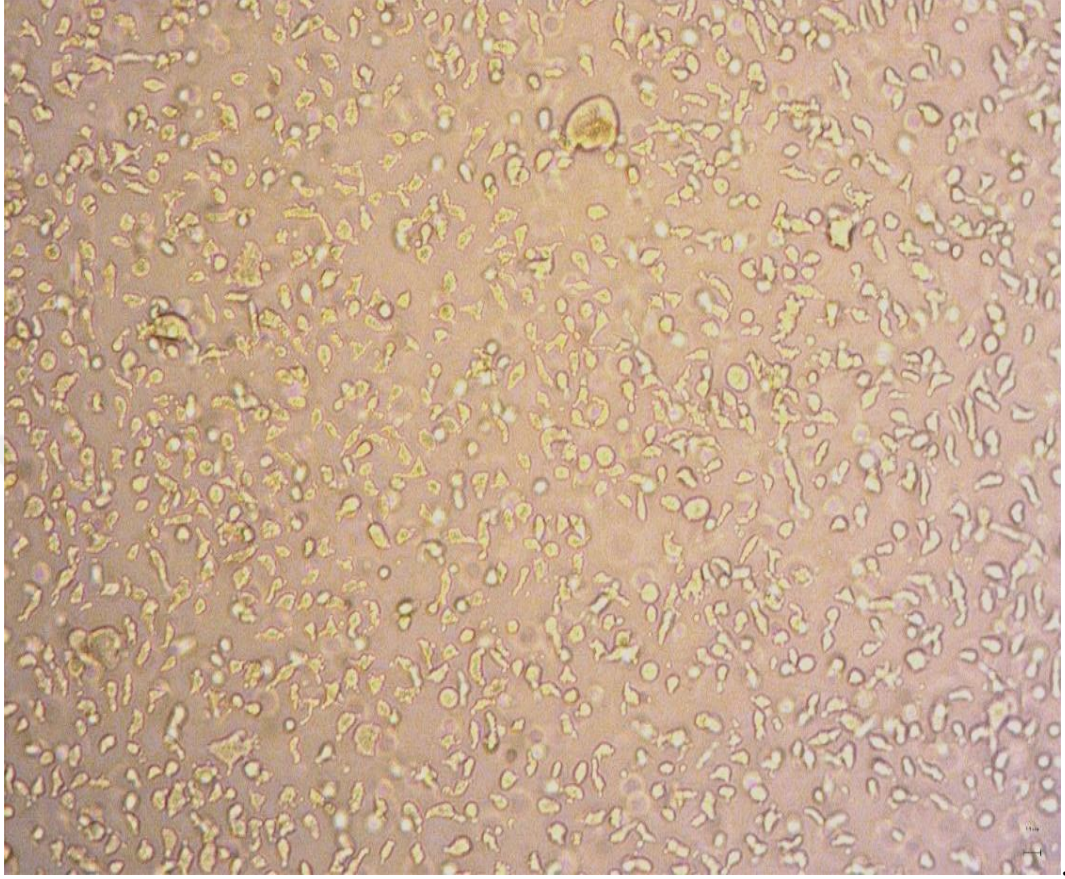
Mikroskop altında thoma lamının hem alt hem üst kısmı gözlemlenerek hücrelerin sayımı gerçekleştirilmiştir. Üst tarafta 162 alt tarafta ise toplamda 154 hücre sayılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Thoma lamı ile hücrelerin sayımı ve ekimi

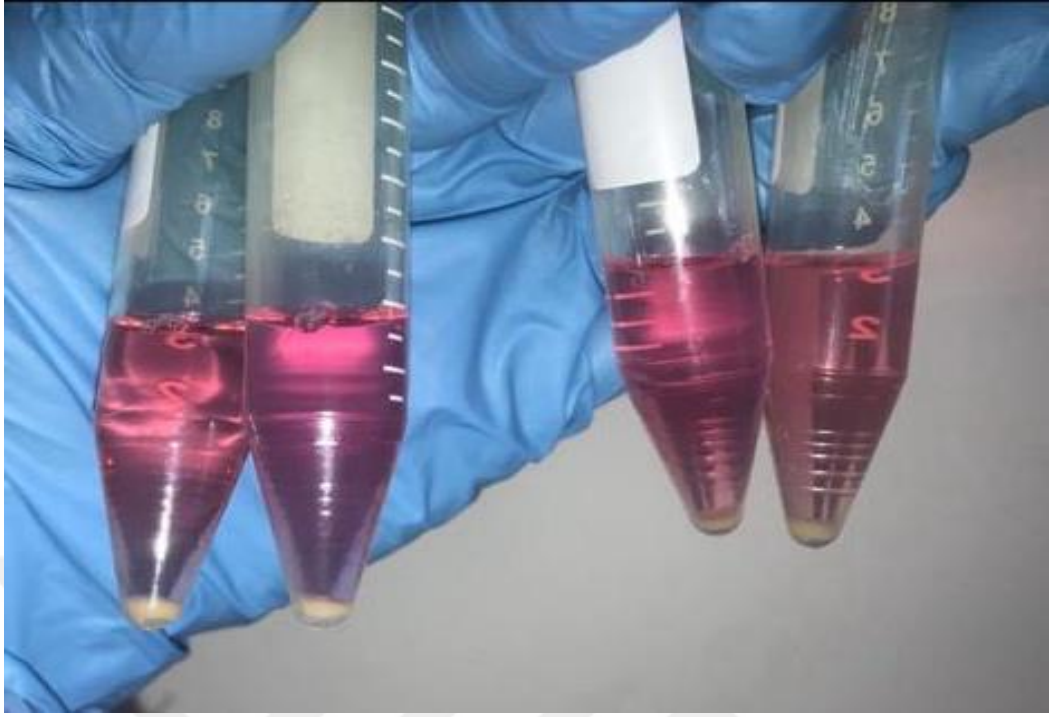
3.1.1.4. *Tripsinazyon aşaması ve pasajlama sonrası hücrelerin görünümü*

Tripsinazyon işleminden sonra hücrelerin görüntüsü Şekil 3.5’ de gösterilmiştir.

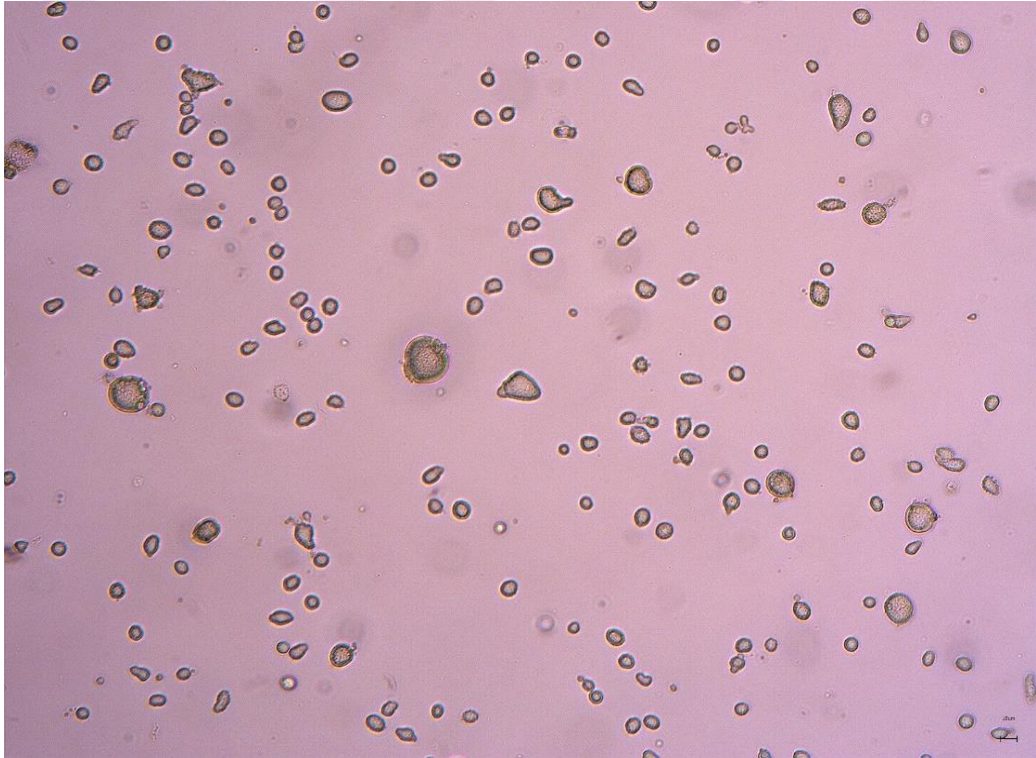


Şekil 3.5. Tripsinazyon sonrası hücrelerin görünümü

Hücrelere pasajlama sırasında santrifüj aşaması yapılmıştır. En alt kısımda hücreler pellet halinde gözükmetedir (Şekil 3.6.). Hücrelerin pasajlama yapıldıktan sonraki görünümüleri (Şekil 3.7)’de gösterilmiştir.



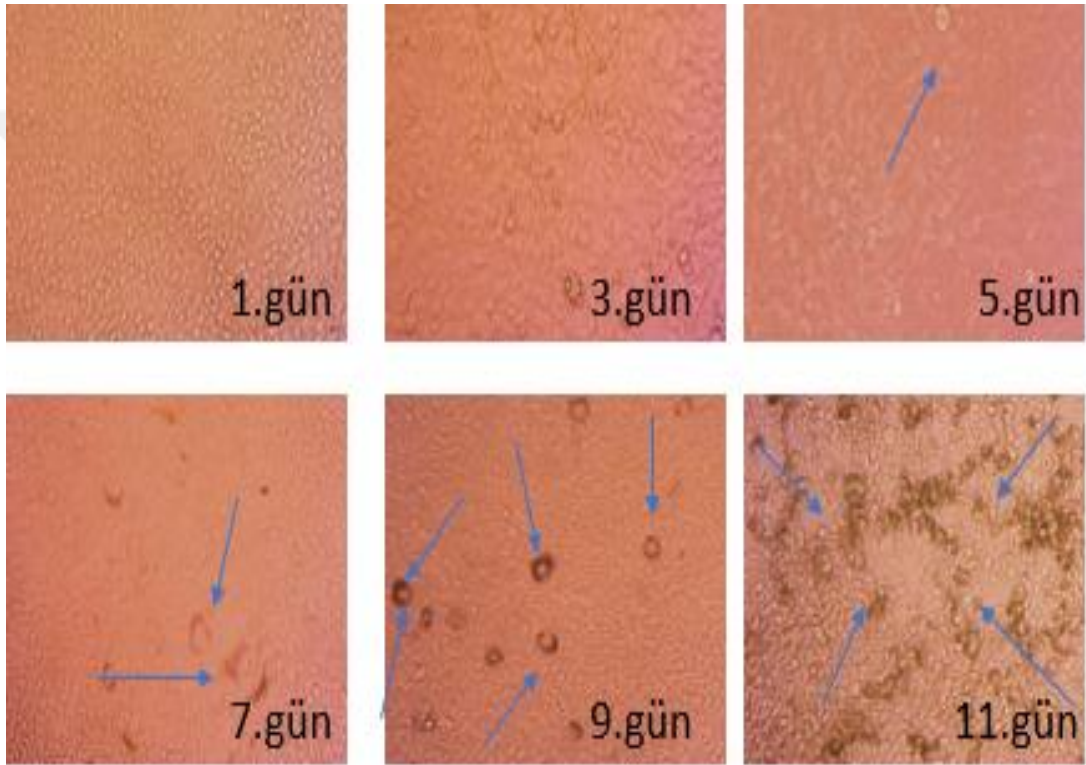
Şekil 3.6. Santrifüj sonrası hücrelerin pellet halinde görünümü



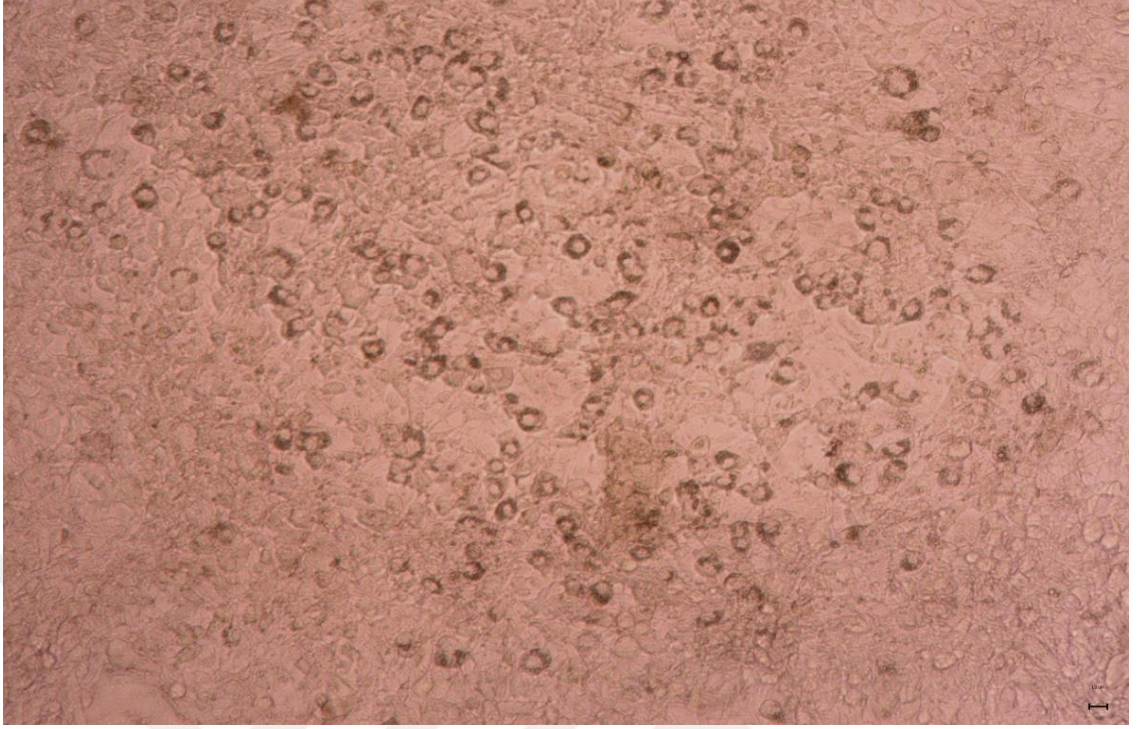
Şekil 3.7. Hücrelerin pasajlama sonrası görünümü

3.1.1.5. Hücreslerin diferansiyasyonu

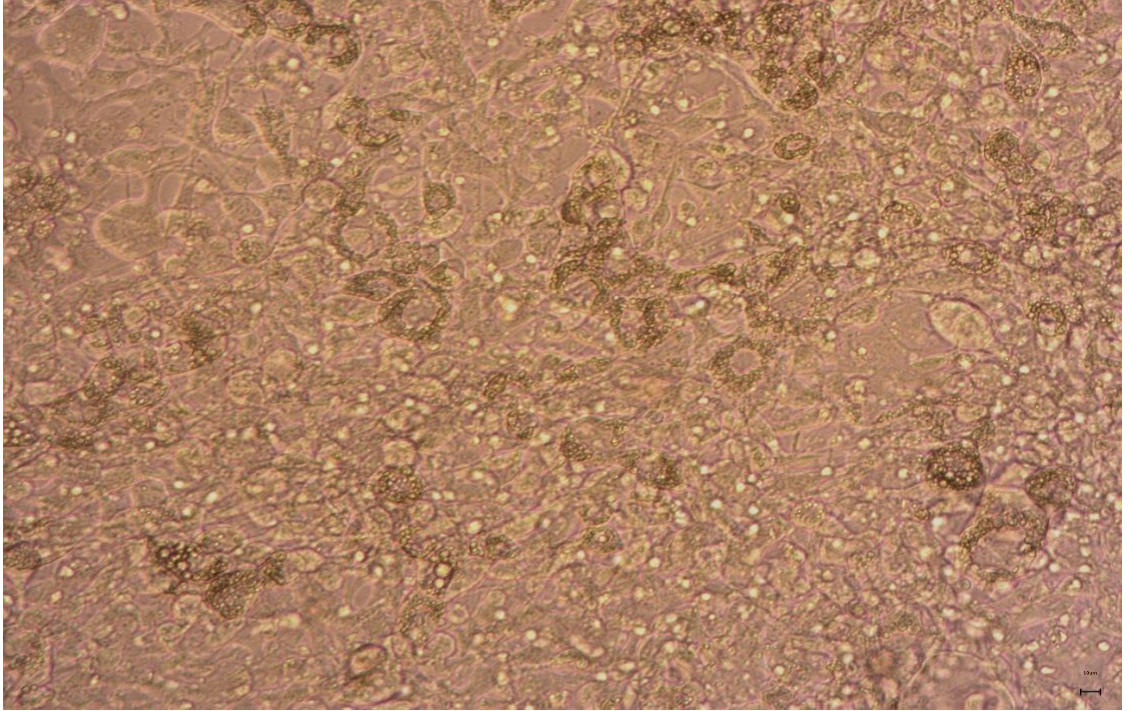
Hücresler diferansiyasyon işleminden önce diferansiyasyona hazırlık işlemi yapılmaktadır. Diferansiyasyona hazırlık uygulamasının ardından (2 gün sonra), diferansiyasyon uygulamasının 5.günde hücrelerin morfolojisinde değışim gözlenmeye başlamıştır. Diferansiyasyon uygulamasının 11.günün sonunda hücreler gözlemlendiğinde kuyucuklarda adiposit hücreler yoğunluğu %90 oranındaydı (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Hücreslerin diferansiyasyon görünümü



Şekil 3.9. Diferansiye olan hücrelerden bir görünüm (12.gün)



Şekil 3.10. Diferansiye olan hücrelerin 20X görünümü

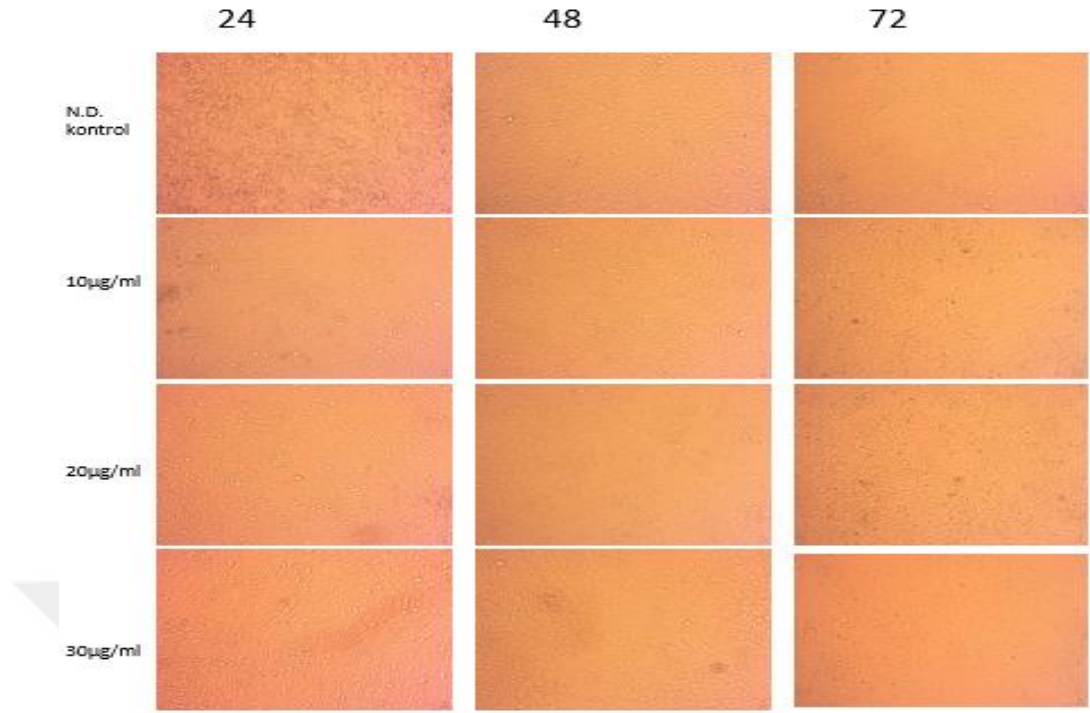
Bir sonraki deneyde kullanılmak üzere hücreler dondurulmuştur. Kriyo-viallere aktararak -196 °C'ye kaldırılmıştır (Şekil 3.3.).

3.1.2. 3T3-L1 hücre hattına *U. dioica* L. ekstraktı konsantrasyon deneme çalışmaları sonuçları

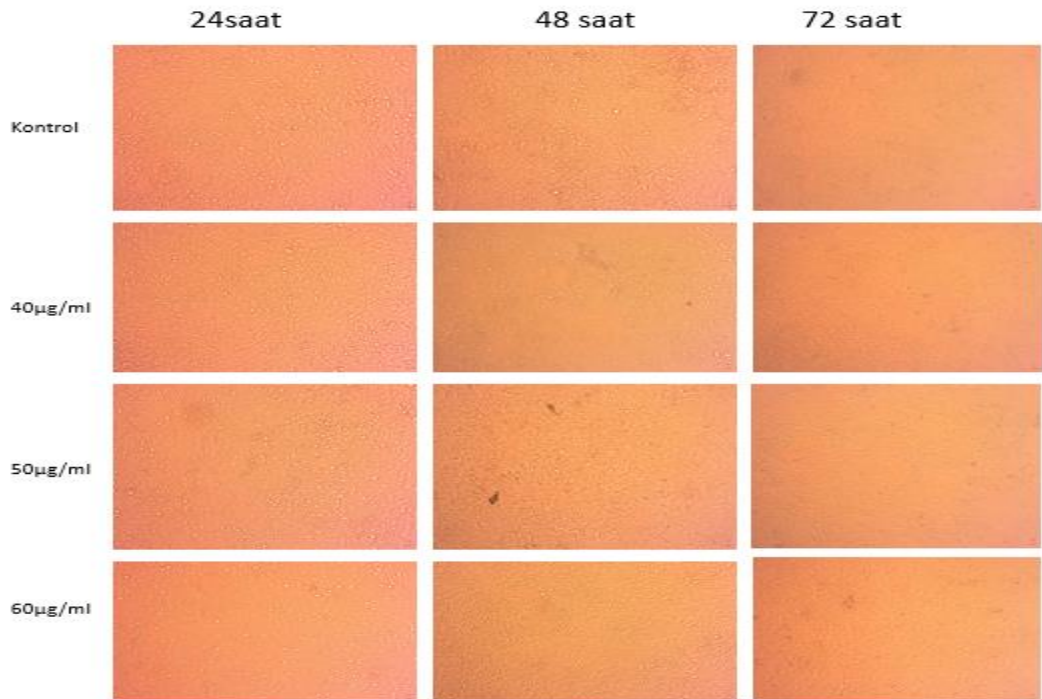
Bitki dozları 10,20,30,40,50,60,80,160,240 µg/ml olacak şekilde 9 farklı konsantrasyon çalışması denenmiştir (Şekil 3.11., 3.12., 3.13.).

Bu denemeler sonunda *U. dioica*'nın 240 µg/ml doz uygulamasında, sitotoksik etki gözlemlendiği için bu dozlar yerine, *U. dioica* etanol çözücüsüyle oluşturulmuş ekstraktlarının 50-100 ve 200 µg/ml'lik dozları hazırlanarak denemeler kurulmuştur. Bu denemeler sonucunda çözücüyle elde edilen dozların denendiği hücrelerde 72 saatlik kısımlarda toksisite meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.13).

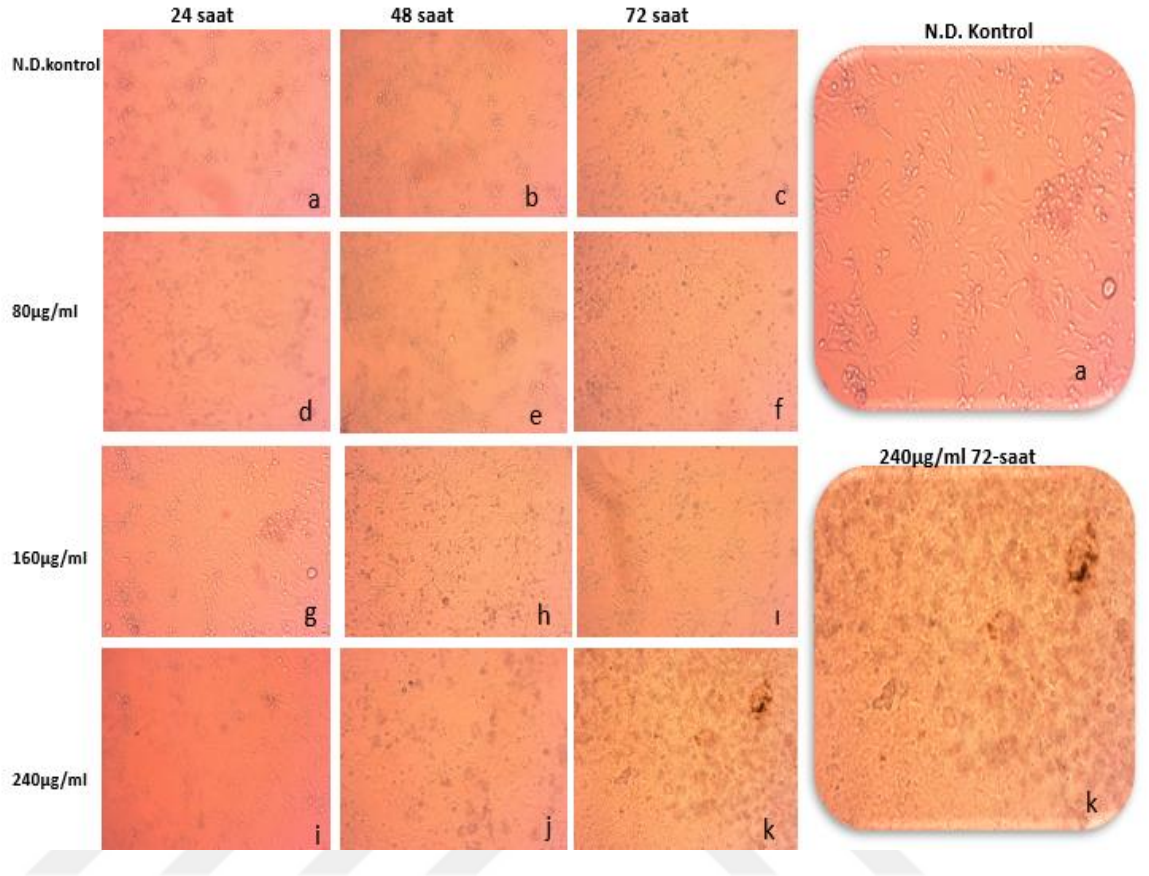
Her iki deneme grubu için 50 ve 100 µg/ml konsantrasyona sahip dozların 24 ve 48 saatlik kısımları uygun bulunmuştur (Şekil 3.11., 3.12.). 72 saatlik kısımlarda hücre morfolojisinde değişimler gözlemlenmiştir. 240 µg/ml dozda 48 ve 72 saatinde hücrelerin yapısının bozulduğu ve açıldığı gözlenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.11. 3T3-L1 pre-adiposit hücre hattına 10-20-30 µg/ml dozlarında bitki ekstraktı denemesi



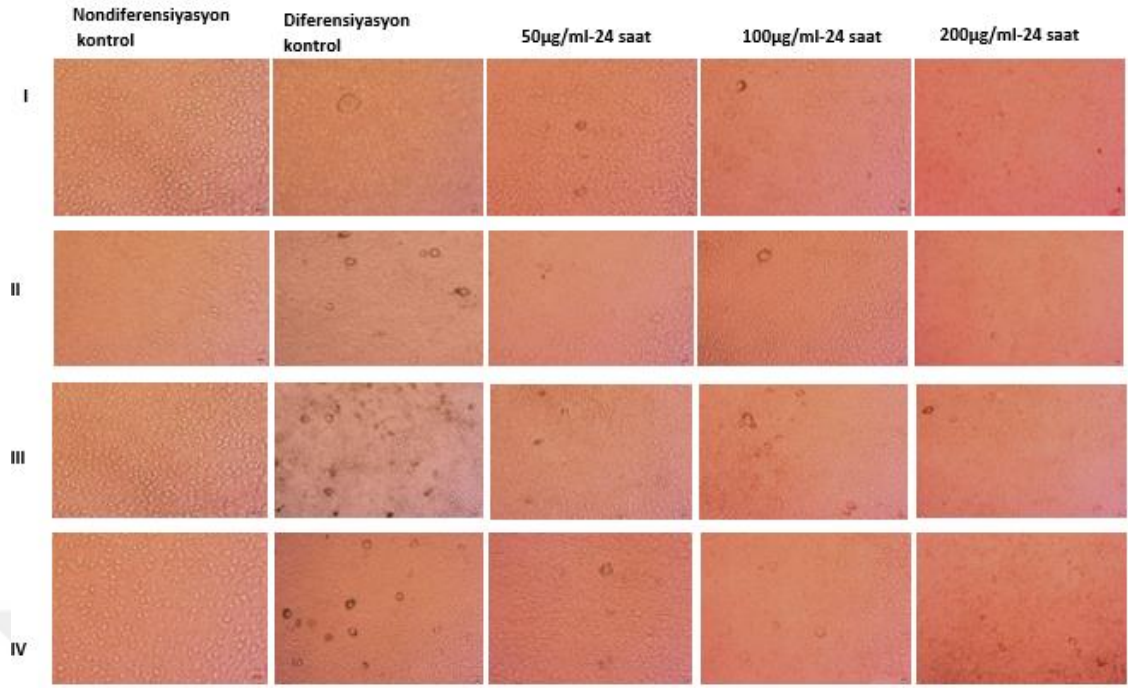
Şekil 3.12. 3T3-L1 pre-adiposit hücre hattına 40-50-60 µg/ml dozlarında bitki ekstraktı denemesi



Şekil 3.13. 3T3-L1 pre-adiposit hücre hattına 80-160-240 µg/ml dozlarında bitki ekstraktı denemesi

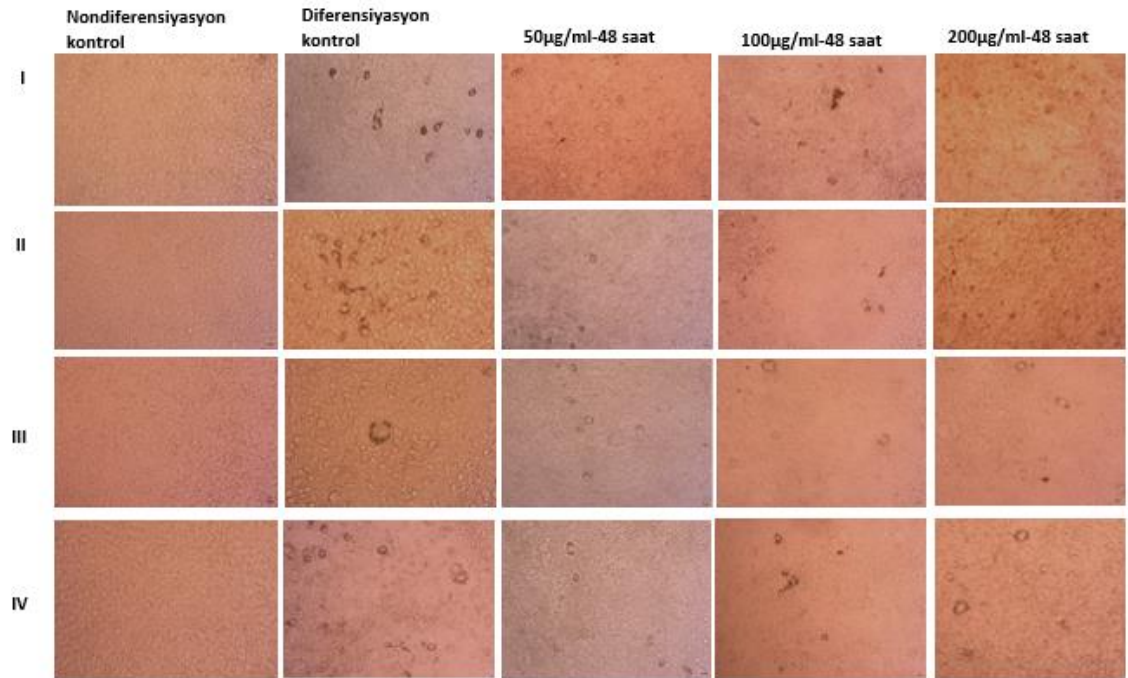
3.1.3. 3T3-L1 hücre hattına LPS ve bitki ekstraktı uygulaması çalışmaları

Hücrelerin kontrol, DM+LPS, 50-100-200 µg/ml bitki üzerine LPS uygulandığında 24 saat sonraki hücrelerin son durumu gösterilmiştir (Şekil 3.14.). Normal hücreler ise 14. günün sonunda hala yapısını korumaktadır. Diferansiye olan hücrelerde ise farklılaşma Şekil (3.14)'de gösterilmiştir. Ayrıca 100 ve 200 µg/ml bitki uygulanan dozlarda farklılaşmış olan yağ hücrelerinin yapısının bozulduğu ve azaldığı mikroskop altında gözlemlenmiştir.



Şekil 3.14. Hücelere LPS ve bitki uygulandıktan sonra hücrelerin 24 saat sonraki görünüşleri

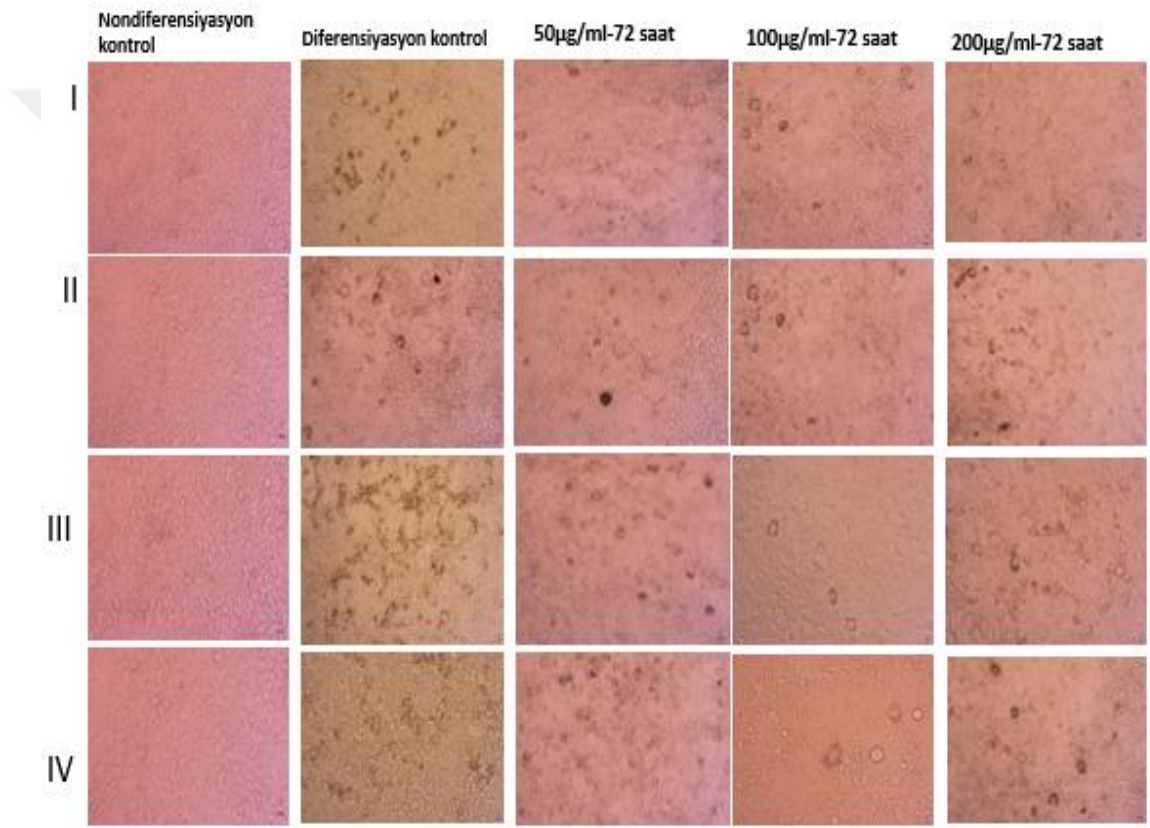
Hücrelerin kontrol, DM+LPS, 50-100-200 µg/ml bitki üzerine LPS uygulandığında 48 saat sonraki hücrelerin son durumu gösterilmiştir (Şekil 3.15.).



Şekil 3.15. Hücelere LPS ve bitki uygulandıktan sonra hücrelerin 48 saat sonraki görünüşleri

Diferansiye olan hücrelerin 48 saat sonra (24 saate göre) daha yoğun olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.15.).

Normal hücreler, farklılaşmış hücreler, DM+LPS, 50-100-200 µg/ml bitki üzerine 10 ng/ml LPS uygulandığında 72 saat sonraki hücrelerin son durumu gösterilmiştir (Şekil 3.16.). 72 saat sonunda hücrelerin daha fazla yağ hücresine dönüştüğü gözlemlenmiştir.

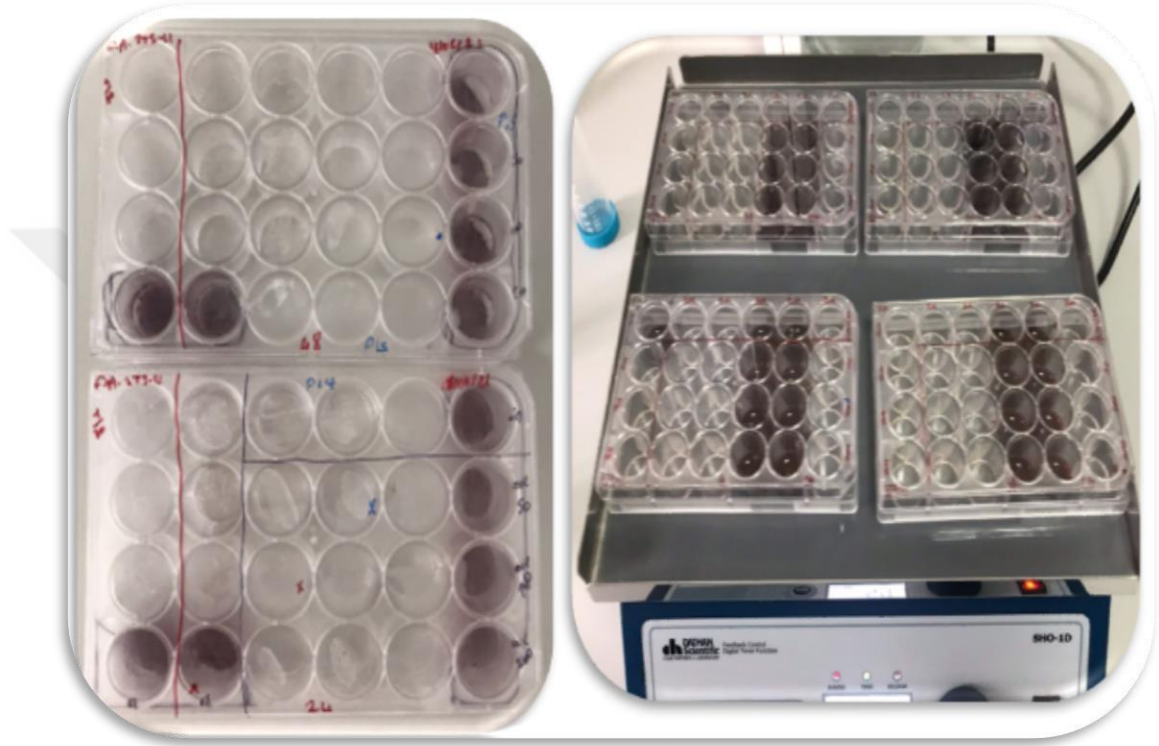


Şekil 3.16. Hücelere LPS ve bitki uygulandıktan sonra hücrelerin 72 saat sonraki görünüşleri

3.1.4. Diferansiye edilen hücrelere Oil Red O boyama yapılması

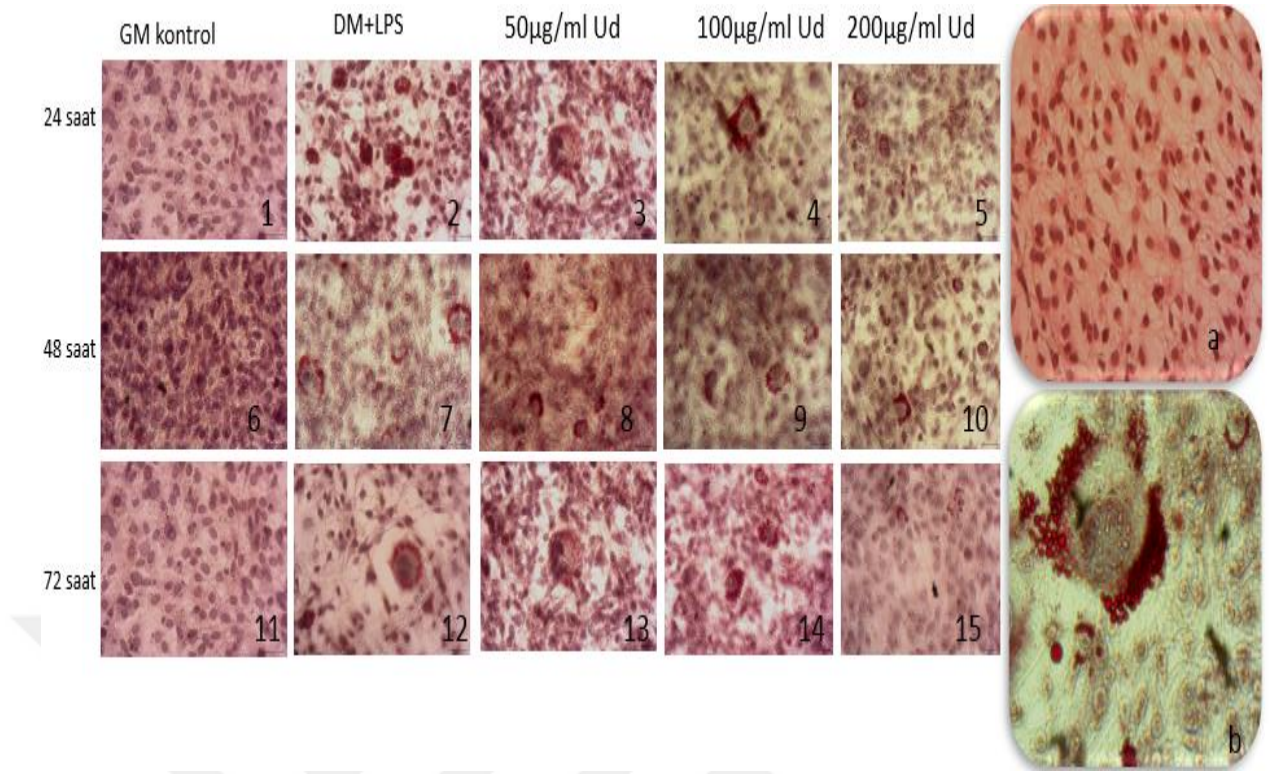
Oil Red-O yağda çözünen bir boyadır ve nötral trigliserin lipoproteinlerde ve lipidlerin boyanmasında kullanılır (Web-2).

Ayrıca hematoksilen hücredeki çekirdekleri mavi-mor bir renge boyamaktadır.



Şekil 3.17. Oil Red-0 boyama aşaması

Hücrelerin Oil Red-O boyaması aşaması (Şekil 3.17.) gösterilmiştir. Non-diferansiyasyon hücre, diferansiyasyon hücre, 50µg/ml, 100µg/ml ve 200µg/ml hücre olan kuyular Oil Red-0 boyası ile boyanmıştır.



Şekil 3.18. Oil Red-O ile boyanan hücrelerin görünümü

Şekil 3.18’de ‘a’ ile gösterilen GM boyandıktan sonraki görünümü verilmiştir, b’de ise yağ hücrelerinin kırmızı rengine boyandığı görülmüştür.

3.2. RNA İzolasyon Sonuçları

Elde edilen RNA'ların kalitesinin değerlendirilmesi ve tüm RNA'ların konsantrasyonunun ölçülmesi için spektrofotometrik ve elektroforetik analiz yapılmıştır.

3.2.1. Spektrofotometrik analiz sonucu

Aşağıdaki çizelgede RNA izolasyonu sonucu 2.deneme örneklerinden elde edilen 24-48 ve 72 saatlik değerler örnek olması açısından verilmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. RNA konsantrasyonu, RNA saflığı, RNA kontaminasyonu değerleri

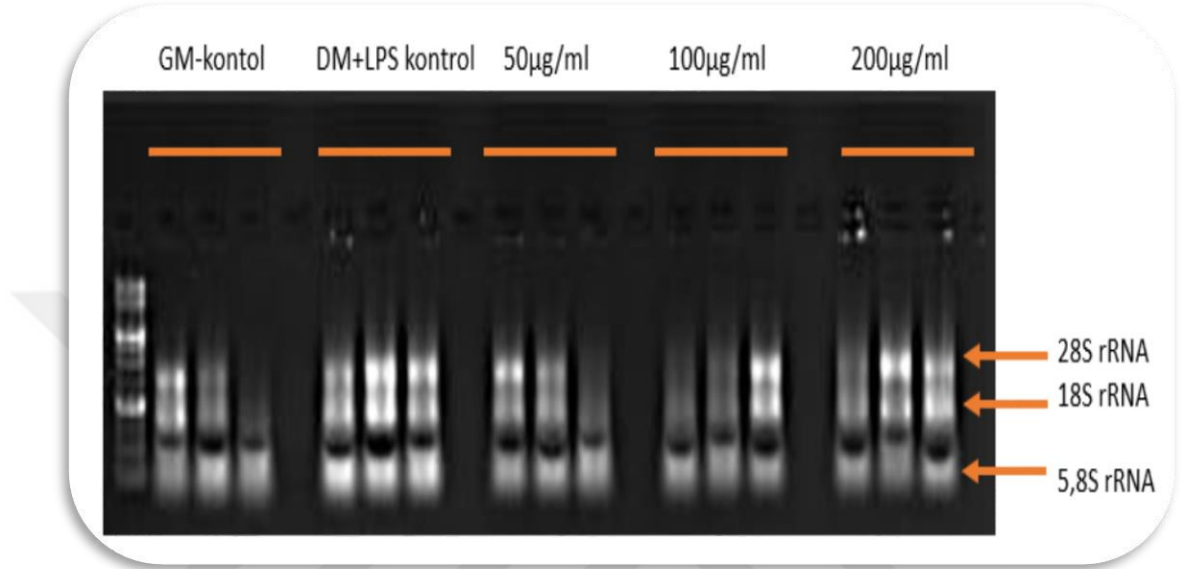
	K. (ng/μl) 24 saat	260/280	260/230	K. (ng/μl) 48 saat	260/280	260/230	K. (ng/μl) 72 saat	260/280	260/230
Gm-Kontrol	850	2,03	0,372	513	2,07	0,0874	552	1,9	0,528
	1063	2,02	0,27	422	2,11	0,4	2163	2,02	0,25
	727	2,05	0,357	453	2,04	0,684	582	1,95	0,532
Dm+LPS	759	2,07	0,182	526	2,11	0,326	812	2,01	0,58
Kontrol	794	2,05	0,274	714	2,1	0,3	496	1,92	0,828
	671	2,09	0,109	606	2,06	0,266	485	2,1	0,621
50μg/ml	753	1,83	0,947	466	2,01	0,496	238	2,04	0,598
	730	2,05	0,273	495	2,05	0,285	373	2,05	0,272
	690	2,04	0,342	322	2,06	0,586	355	1,76	0,897
100μg/ml	660	1,97	0,266	729	2,1	0,268	353	1,99	0,587
	662	1,96	0,862	721	2,12	0,198	394	1,83	0,862
	570	2	0,586	586	2,07	0,439	367	1,98	0,586
200μg/ml	551	1,98	0,855	585	2	0,0627	387	2	0,219
	482	1,97	0,723	433	1,97	0,304	315	1,97	0,32
	511	1,86	0,779	475	1,95	0,429	302	1,95	0,701

(K: Konsantrasyon)

3.2.2. Elektroforetik analiz sonucu

Tüm hücrelerden RNA izolasyonuna gidildikten sonra RNA'nın olup olmadığı %1'lik agaroz jelde koşturularak RNA'nın varlığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.19.).

Jel sonucuna göre RNA'nın 3 alt birimi Şekil 3.19' da gösterilmiştir.



Şekil 3.19. RNA izolasyonu sonrası RNA'ların 3 alt biriminin agaroz jelde görünümü

3.3. Real Time Kantitatif PCR Sonuçları

3.3.1. qPCR sonrası elde edilen verilerin değerlendirilmesi

qPCR sonucunda tüm genlerin 24 saatlik ve 48 örneklerin CT değerleri alınmıştır.

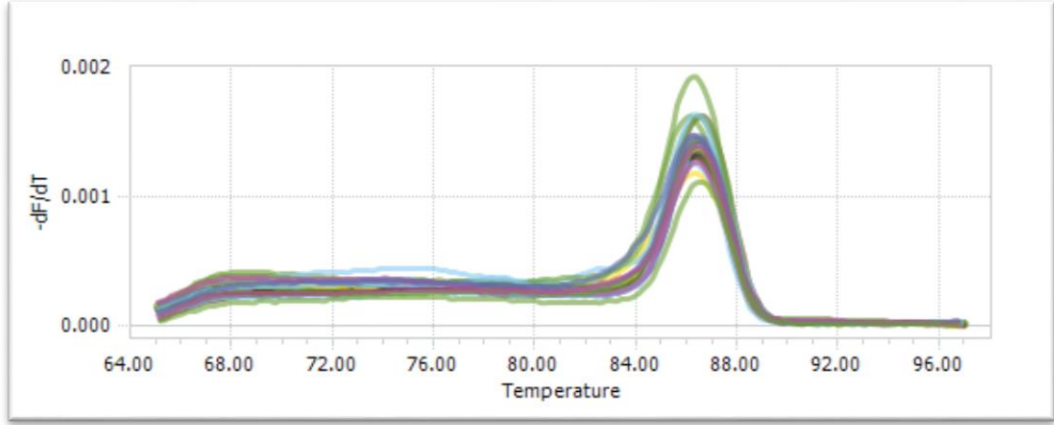
CT değerlerinin uygunluğu negatif kontrole göre belirlenmiştir. Excelde hesaplama yapılırken CT değerleri baz alınarak grafikler oluşturulmuştur. Ayrıca negatif kontrolün üzerinde olan CT değerleri hesaba katılmamıştır.

3.3.1.1. *Fasn için elde edilen qPCR analiz sonuçları*

Kantitatif Real-Time PCR sonucu elde edilen CT değerlerine göre hesaplama yapılırken her örnek grubu için iki teknik, iki biyolojik tekrar yapılmıştır ve bu örneklerin CT değerleri kullanılmıştır. Grafik oluşturabilmek için bu değerlerin ortalaması, standart sapması ve standart hatası hesaplanmıştır. Hesaplama yapılırken 18S geninin bağıl mRNA ekspresyonu hesaplamada normalizasyon olarak kullanılmıştır. Tüm genler elde edilen cDNA örnekleriyle çalışılmıştır.

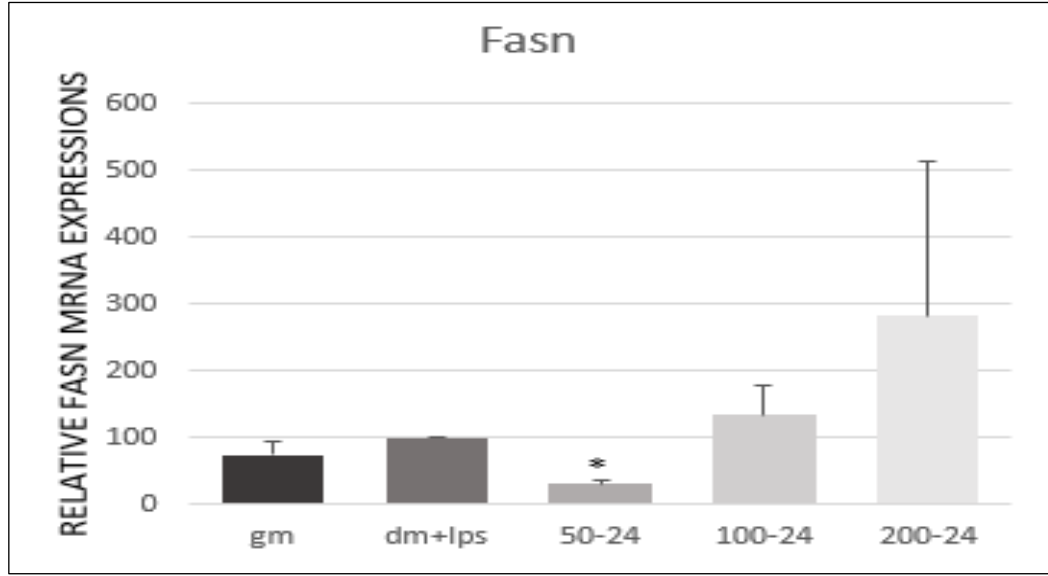
Ttest sonucuna göre Fasn geninin 50-24 örneği $P < 0.05$ den küçük çıkması nedeniyle anlamlı olarak kabul edilmiştir. Ancak 100-24 $\mu\text{g/ml}$ ve 200-24 $\mu\text{g/ml}$ örneklerinin ttesti sonucu 0.05' den büyük olduğu için istatistiki olarak değerlendirildiğinde anlamsız olduğu söylenebilir.

Erime eğrisinin qPCR sonucunda elde edilen tüm piklerin aynı zamanda olduğu, farklı DNA ve primer dimeri kontaminasyonundan kaynaklı herhangi bir pik eldesi olmadığına karar verilmiştir (Şekil 3.20.).



Şekil 3.20. Fasn geninin erime eğrisi grafiği

Elde edilen tüm değerler ile grafik oluşturulmuştur. Oluşturulan grafikteki değerler ttest sonucuna göre değerlendirilmiş ve istatistiki olarak anlamlılığı kıyaslanmıştır. Yapılan bu çalışmada 3T3-L1 farklılaşmamış hücre gruplarına göre 3T3-L1 adipositlerinin ekspresyonunun arttığı fakat anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir. Adiposit hücrelerine farklı dozlarda *U. dioica* ekstraktı uygulanması ile 50 µg/ml dozunun, adipositeyle birlikte artış gösteren Fasn ekspresyonunun azalmasını sağlamıştır ve istatistiki olarak tetst sonucu anlamlı çıkmıştır. 100-200 µg/ml dozları ise istatistiki olarak anlamlı çıkmamıştır (Şekil 3.21.).



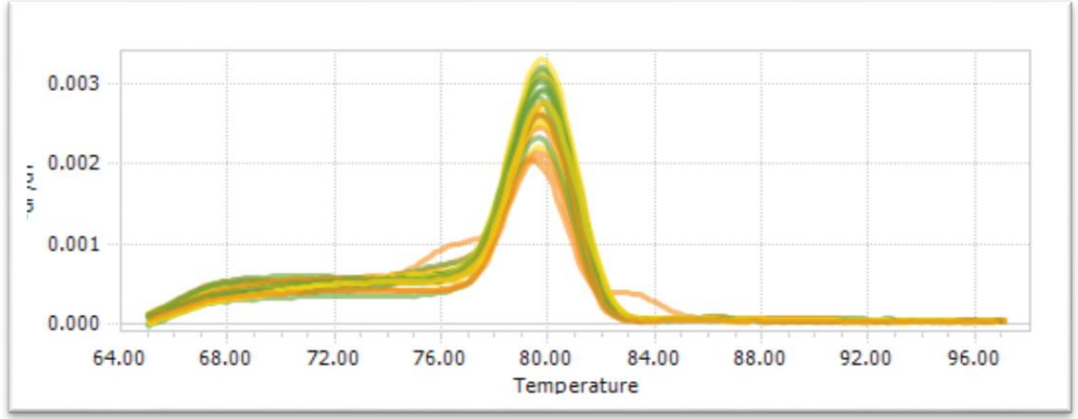
Şekil 3.21. Fasn geninin bağıl mRNA ekspresyonu grafiği

*, farklılaşmış hücre ile kıyaslandığında, $p < 0,05$ değerini gösterir (Şekil 3.21.).

3.3.1.2. LPL geni için elde edilen qPCR analiz sonuçları

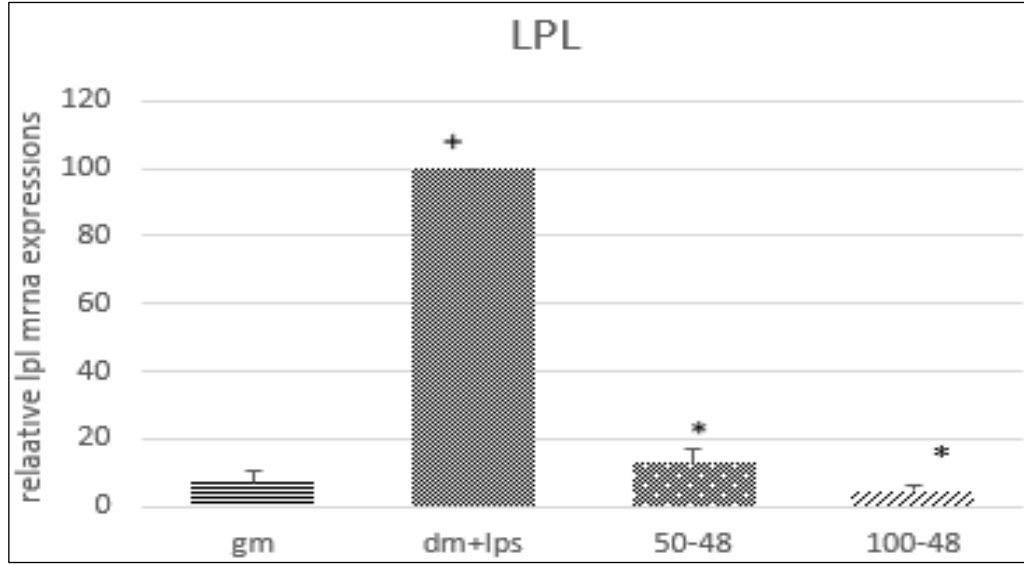
LPL geninin qPCR sonucu sonrasında her örnek grubu için CT değerleri gösterilmiştir. Bu CT değerleri excelde hesaplanarak her örneğin ΔCT değerleri 18S house keeping ile hesaplanmıştır. Ardından tüm örneklerin $2^{(-\Delta CT)}$ değerleri hesaplanmıştır. Tüm örneklerin DM+LPS'e göre yüzdelikleri hesaplanmıştır. Beş farklı örneğin ortalaması, standart sapması ve standart hesabı gerçekleştirilmiştir.

qPCR sonucuna göre elde edilen CT değerlerinde tüm örneklerin erime eğrisine bakılmıştır ve tek bir yerde melting eğrisi oluşmuştur. Bu da DNA kontaminasyonu ve primer dimerlerinin olmadığını göstermektedir (Şekil 3.22.).



Şekil 3.22. LPL geninin erime eğrisi grafiği

Elde edilen 48 saatlik tüm veriler ile grafik oluşturulmuştur. Oluşturulan grafikteki değerler ttest sonucuna göre değerlendirilmiş ve istatistiki olarak anlamlılığı kıyaslanmıştır. Yapılan bu çalışmada 3T3-L1 farklılaşmamış hücre gruplarına göre 3T3-L1 adipositlerinin ekspresyonunun arttığı ve anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. Adiposit hücrelere farklı dozlarda *U. dioica* ekstraktı uygulanması ile 50 µg/ml, 100 µg/ml, dozunun LPS ve adipositeyle birlikte artış gösteren LPL ekspresyonunun down-regülasyonunu sağlanmıştır ve istatistiki olarak değerlendirildiğinde ttest sonucu anlamlı çıkmıştır (Şekil 3.23.). Ancak bitkinin 200 µg/ml dozu istatistiki olarak anlamlı değildir. Bu yüzden grafiğe eklenmemiştir. 24 ve 72 saatlik LPL örnekleri istatistiki olarak anlamlı çıkmadığı için grafiğe eklenmemiştir.



Şekil 3.23. LPL geninin bağıl mRNA ekspresyon grafiği

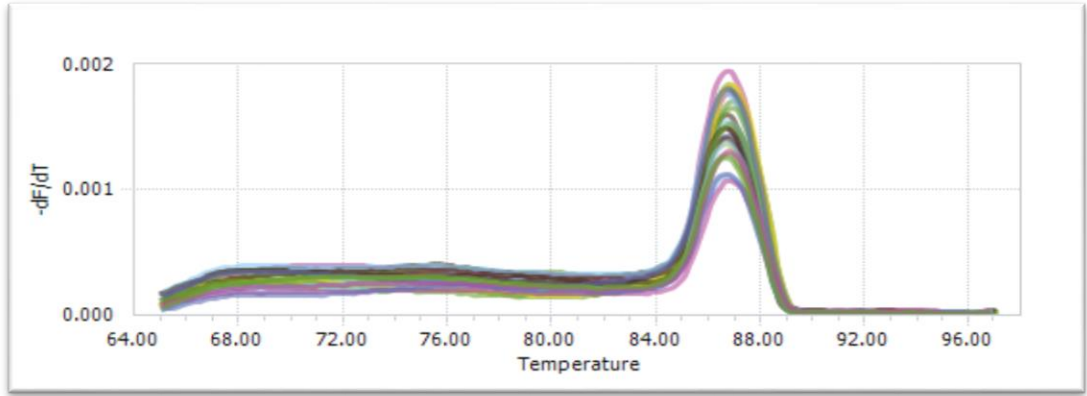
+, farklılaşmamış hücre kontrol grubu ile kıyaslandığında $p < 0,001$ değerini gösterir.

*, farklılaşmış hücre ile kıyaslandığında, $p < 0,05$ değerini gösterir.(Şekil 3.23.).

3.3.1.3. DGAT-1 geni için elde edilen qPCR analiz sonuçları

DGAT-1 geninin qPCR sonrasında her örnek grubu için CT değerleri kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Bu CT değerleri excelde hesaplanarak her örneğin ΔCT değerleri 18S house keeping geninden çıkarılarak hesaplanmıştır. Ardından tüm örneklerin $2^{(-\Delta CT)}$ değerleri hesaplanmıştır. Tüm örneklerin DM+LPS'e göre yüzdelikleri alınmıştır. Beş farklı örneğin ortalaması, standart sapması ve standart hesabı gerçekleştirilmiştir.

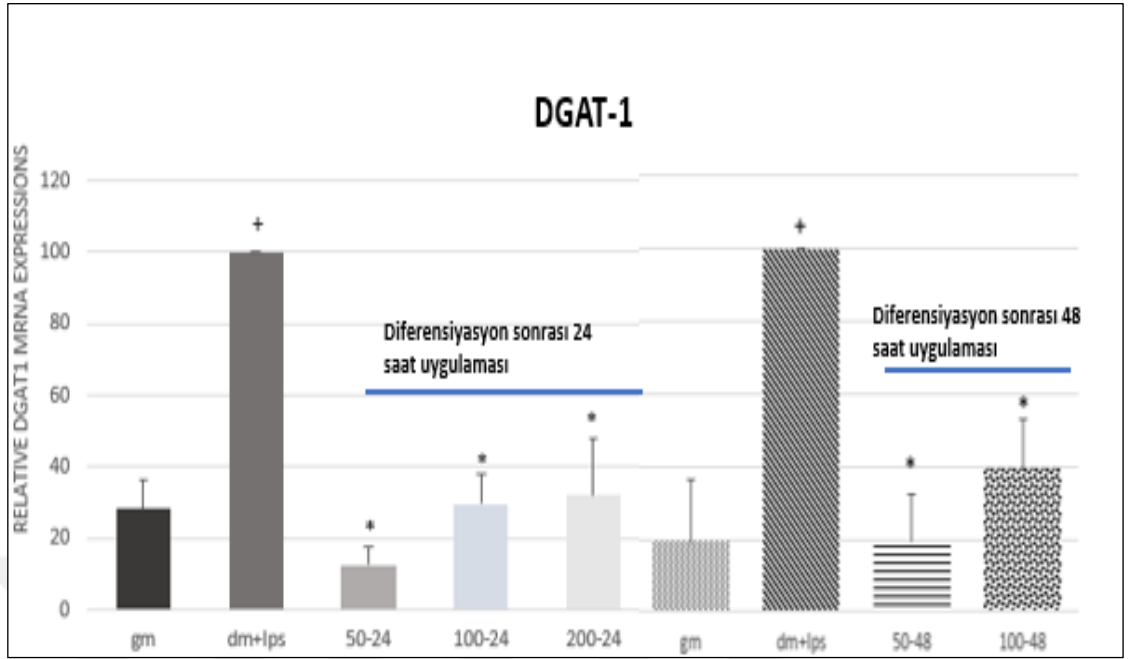
DGAT-1 geni içinde qPCR sonucuna göre elde edilen CT değerlerinde tüm örneklerin erime eğrisine bakılmıştır ve tek bir yerde melting eğrisi oluşmuştur. Bu da DNA kontaminasyonu ve primer dimerlerinin olmadığını göstermektedir (Şekil 3.24.).



Şekil 3.24. DGAT-1 geninin erime eğrisi grafiği

Elde edilen tüm veriler doğrultusunda grafik oluşturulmuştur. Oluşturulan grafikteki değerler ttest sonucuna göre değerlendirilmiş ve istatistiki olarak anlamlılığı kıyaslanmıştır. Yapılan bu çalışmada 3T3-L1 farklılaşmamış hücre gruplarına göre 3T3-L1 adipositlerinin ekspresyonunun arttığı ve anlamlı olduğu gözlemlenmiştir. Adiposit hücrelere farklı dozlarda *U. dioica* ekstraktı uygulanması ile 24 saat için 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml dozunun LPS ve adipositeyle birlikte artış gösteren DGAT-1 ekspresyonunun down-regülasyonu sağlanmıştır ve istatistiki olarak değerlendirildiğinde ttest sonucu anlamlı çıkmıştır (Şekil 3.25).

U. dioica ekstraktı uygulanması ile 48 saat için 50 µg/ml, 100 µg/ml dozları LPS ve adipositeyle artış gösteren DGAT-1 geninin ekspresyonunun azalmasına neden olmuştur ve istatistiki olarak anlamlıdır. Ancak bitkinin 200 µg/ml dozu istatistiki olarak anlamlı değildir. Bu yüzden grafiğe eklenmemiştir (Şekil 3.25.).



Şekil 3.25. DGAT-1 geninin bağıl mRNA ekspresyon grafiği

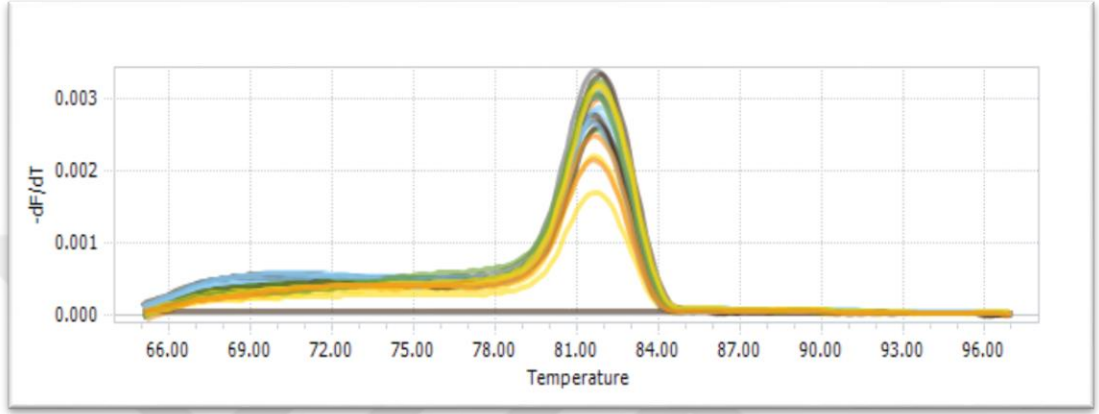
+, farklılaşmamış hücre kontrol grubu ile kıyaslandığında $p < 0,001$ değerini gösterir.

*, farklılaşmış hücre ile kıyaslandığında, $p < 0,05$ değerini gösterir (Şekil 3.25.).

3.3.1.4. MCP-1 geni için elde edilen qPCR analiz sonuçları

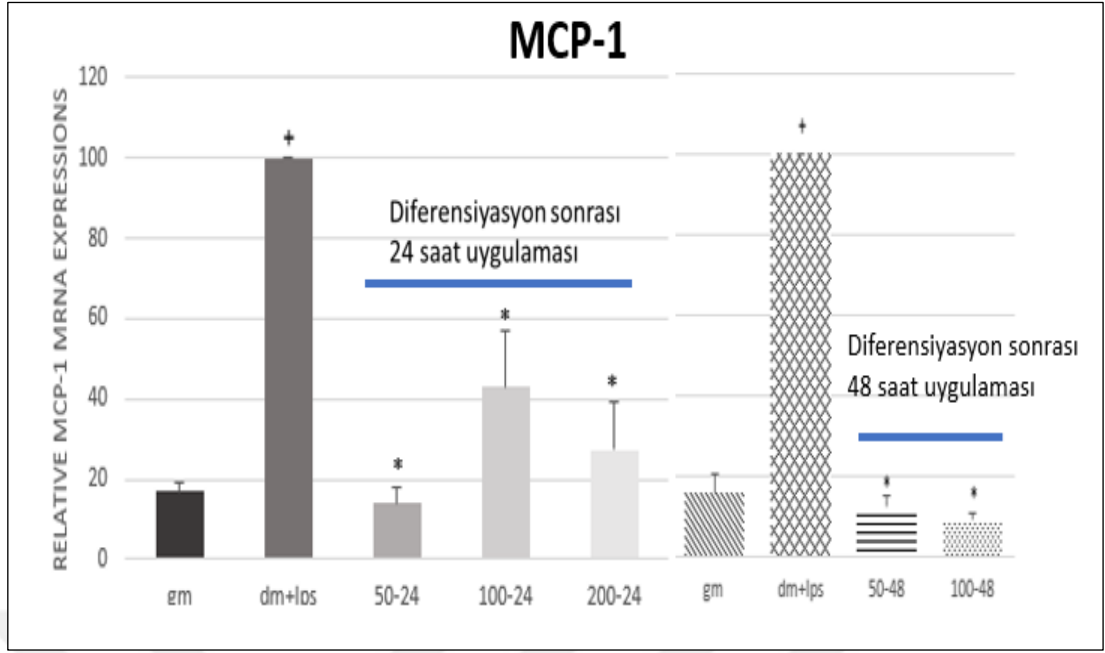
MCP-1 geni için qPCR sonrasında her örnek grubu için CT değerleri alınmıştır ve bu değerlerin ortalamasının, standart hatasının ve standart sapmasının hesaplanması sağlanmıştır. Housekeeping olarak kullanılan 18S geninin aynı örneklerinin CT değerleri alınarak yapılmıştır.

Elde edilen CT değerlerinde farklı DNA'ların ya da primer dimerlerinin etkisinin olup olmadığını gözlemlemek için erime eğrisi grafiğine bakılmıştır. Melting piklerinin aynı sıcaklıkta olması CT değerlerinin tek amplikondan gelen floresan ışımayla elde edildiğini göstermektedir ve MCP-1 erime eğrisi tek bir yerde pik vermiştir (Şekil 3.26.).



Şekil 3.26. MCP-1 geninin erime eğrisi grafiği

Uygun görülen örnek gruplarının CT değerlerinden elde edilen grafikte diferansiyasyonla artan MCP-1 ekspresyonunun *U. dioica* ekstraktlarının 50-100-200 µg/ml olan 24 saatliklerin ekspresyonunda düşüş olduğu aynı zamanda 50-100 µg/ml dozlarının 48 saatliklerinin ekspresyonunda da düşüş gözlemlenmiştir ve preadipositlerin ekspresyon seviyesiyle ekstrakt uygulanmış adipositlerin MCP-1 ekspresyonunun birbirine yakın seyrettiği görülmüştür. Bu downregulasyonun istatistiki olarak değerlendirildiğinde anlamlı olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 3.27.). 72 saatlik örnekler değerlendirildiğinde istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.27. MCP-1 geninin bağıl mRNA ekspresyonu grafiği

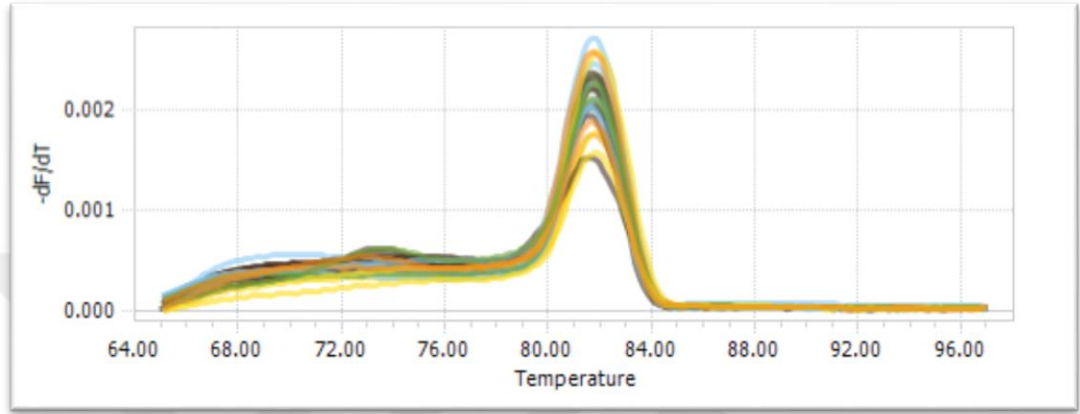
+, farklılaşmamış hücre kontrol grubu ile kıyaslandığında $p < 0,001$ değerini gösterir.

*, farklılaşmış hücre ile kıyaslandığında, $p < 0,05$ değerini gösterir (Şekil 3.27.).

3.3.1.5. BRCA-1 geni için elde edilen qPCR analiz sonuçları

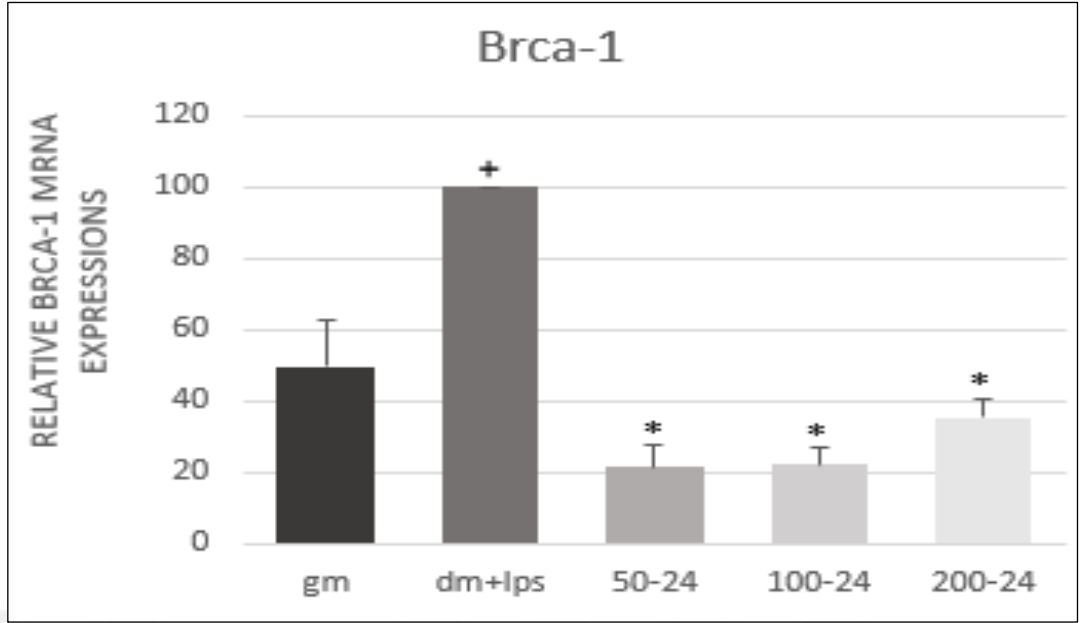
BRCA-1 geninin qPCR sonrasında her örnek grubu için CT değerleri kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Bu CT değerleri excelde hesaplanarak her örneğin ΔCT değerleri alınarak, 18S house keeping geninden çıkarılarak hesaplanmıştır. Daha sonra tüm örneklerin $2^{(-\Delta CT)}$ değerleri hesaplanmıştır. Tüm örneklerin DM+LPS'e göre yüzdelik oranları excelde hesaplanmıştır. Beş farklı örneğin ortalaması, standart sapması, standart hesabı ve ttest sonucu gerçekleştirilmiştir.

Tüm örneklerden elde edilen CT değerlerinde farklı DNA'ların ya da primer dimerleri olup olmadığını gözlemlemek için erime eğrisi grafiğine bakılmıştır. Erime eğrisinin aynı sıcaklıkta olması CT değerlerinin tek amplikondan gelen floresan ışımayla elde edildiğini göstermektedir ve BRCA-1 geninin erime eğrisi tek bir yerde pik vermiştir (Şekil 3. 28.).



Şekil 3.28. BRCA-1 geninin erime eğrisi

Elde edilen verilen doğrultusunda uygun bulunan örneklerle oluşturulan grafikte BRCA-1 geninin 24 saatlik örneklerinin adiposite durumunda ekspresyonunun arttığı artan ekspresyonun *U. dioica* ile inhibe edildiği gözlenmiştir (Şekil 3.29.). Bitkinin 50-100-200µg/ml dozlarının adiposite durumundaki hücrelerle kıyaslandığında anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir ve veriler sonucunda istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 2.29.). Ancak 48 ve 72 saatlik örnekler değerlendirildiğinde istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 3.29. BRCA-1 geninin bağıl mRNA ekspresyon grafiği

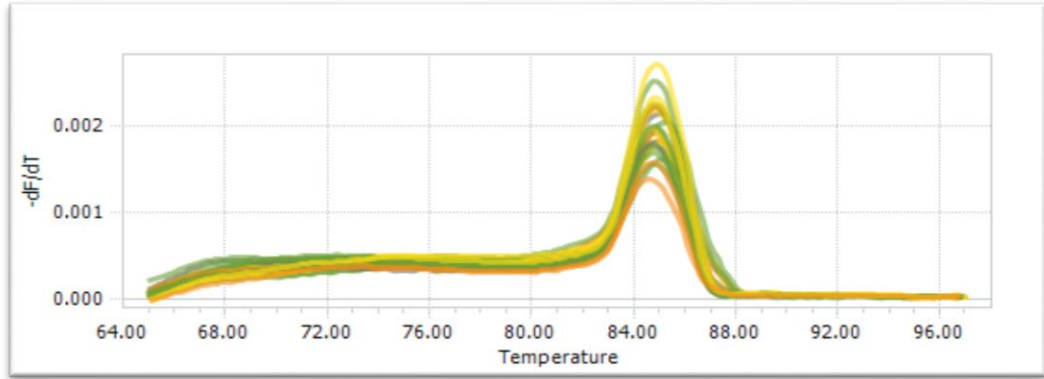
† , farklılaşmamış hücre kontrol grubu ile kıyaslandığında $p < 0,001$ değerini gösterir.

* , farklılaşmış hücre ile kıyaslandığında, $p < 0,05$ değerini gösterir (Şekil 3.29.).

3.3.1.6. BRCA-2 geni için elde edilen qpcr analiz sonuçları

BRCA-2 geni qPCR sonrası elde edilen CT değerleri göz önüne alındığında tüm gruplardan elde edilen değerlerin standart sapması, ortalaması ve standart hatası hesaplanmıştır. Son olarak tüm örneklerin ttest sonucu değerlendirilmiştir. Ttest sonucuna göre bitkinin 50-100-200 $\mu\text{g/ml}$ dozları $p > 0.05$ ’ den küçük çıktığı için istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur.

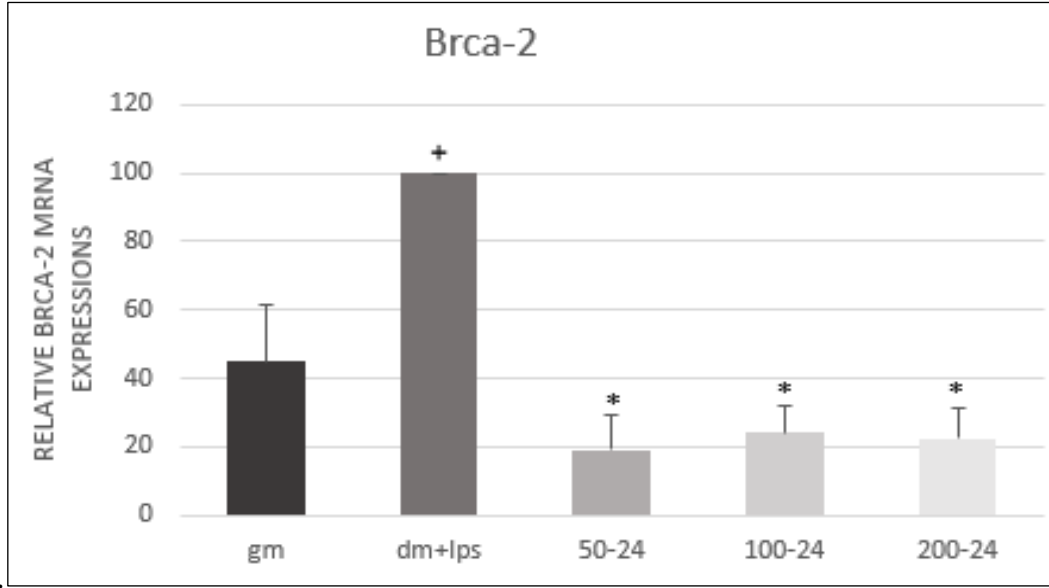
Tüm örneklerden elde edilen CT değerlerinde farklı DNA’ların ya da primer dimerleri olup olmadığını gözlemlemek için erime eğrisi grafiğine bakılmıştır. Erime eğrisinin aynı sıcaklıkta olması CT değerlerinin tek amplikondan gelen floresan ışımayla elde edildiğini göstermektedir ve BRCA-2 geninin erime eğrisi tek bir yerde pik vermiştir (Şekil 3. 30.). Buda sonuçların güvenilirliğini göstermektedir.



Şekil 3.30. BRCA-2 geninin erime eğrisi grafiği

BRCA-2 geni için 24 saatlik tüm örnek gruplarının CT değerleri alınmıştır. Elde edilen grafikte diferansiyasyonla artan BRCA-2 ekspresyonunun *U. dioica* ekstraktlarının 50-100-200 µg/ml dozlarında ve farklı zamanlarda uygulanması ile ekspresyonun düştüğü ve preadipositlerin ekspresyon seviyesiyle ekstrakt uygulanmış adipositlerin BRCA-2 geninin ekspresyonunun birbirine yakın seyrettiği görülmüştür. Bu downregulasyon istatistiki olarak değerlendirildiğinde anlamlı olduğu ortaya konulmuştur (Şekil 3.31.).

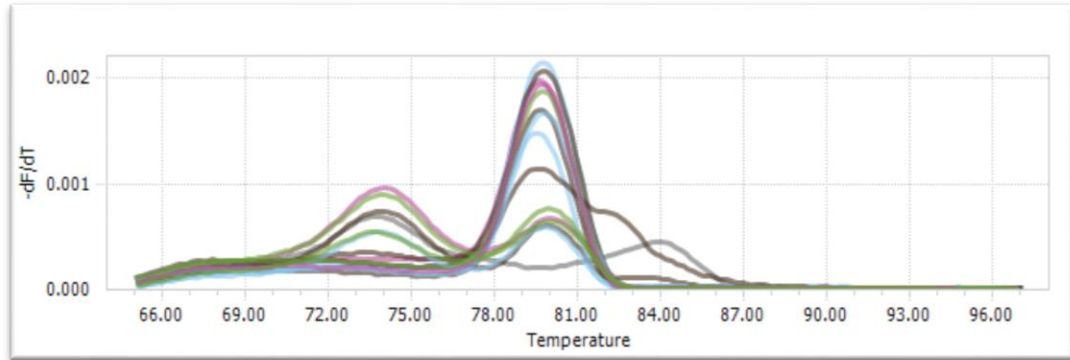
BRCA-2 için sadece 24 saatteki değerleri istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. 48 ve 72 saatlik değerleri ise istatistiki olarak değerlendirdiğimizde anlamlı bulmadık.



Şekil 3.31. BRCA-2 bağıl mRNA ekspresyon grafiği

† , farklılaşmamış hücre kontrol grubu ile kıyaslandığında $p < 0,05$ değerini gösterir.
 * , farklılaşmış hücre ile kıyaslandığında, $p < 0,05$ değerini gösterir (Şekil 3.31.).

qPCR sonucuna göre IL-6 ve HER-2 genlerinin transkripsiyonel düzeyde sonuçları incelendiğinde erime eğrileri tek bir yerde pik vermedi (Şekil 3.32.) ve istatistiki olarak değerlendirildiğimizde anlamlı çıkmadı bu yüzden grafik ve diğer sonuçları vermedik.

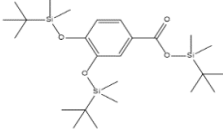
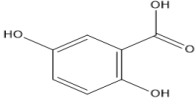
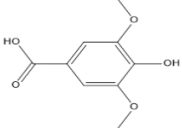
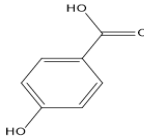
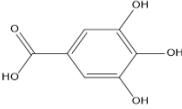
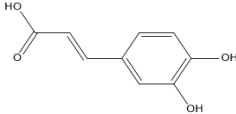


Şekil 3.32. IL-6 geninin erime eğrisi grafiği

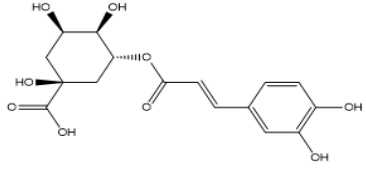
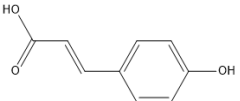
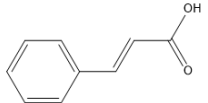
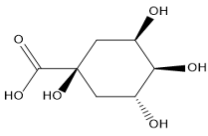
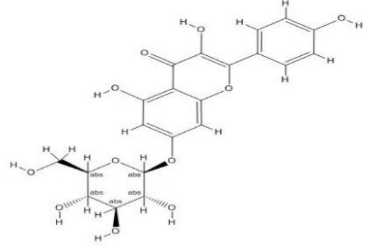
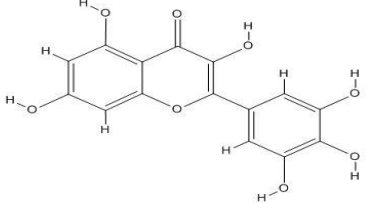
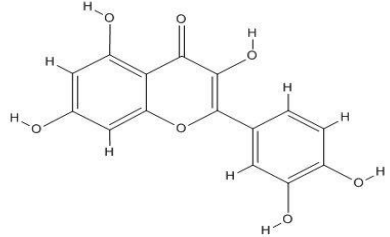
3.4. MolekülerYerleştirme Çalışmaları

3.4.1. Ligand hazırlama

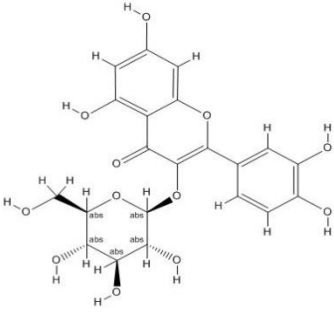
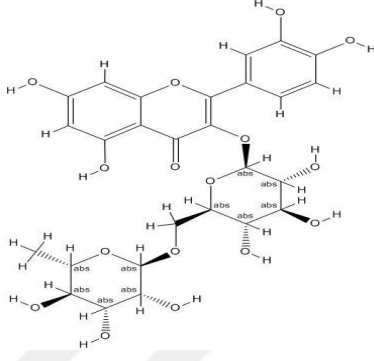
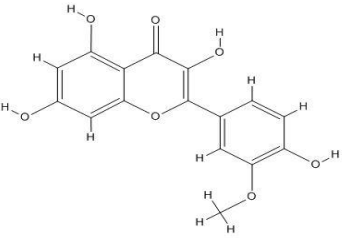
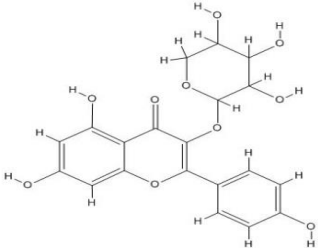
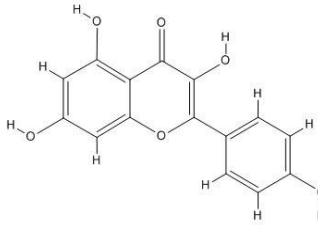
Çizelge 3.2. *U. dioica* bileşenlerinin ligandlarının pubchem ID numarası ve 2D molekül yapıları

Pubchem ID numarası	BİLEŞİK ADI	2D MOLEKÜLER YAPISI
528594	Procatechuic acid	
3469	Gentisic acid (2,5-dihydroxybenzoic acid)	
10742	Syringic acid	
135	p-hydroxybenzoic acid	
370	Gallic acid	
689043	Caffeic acid	

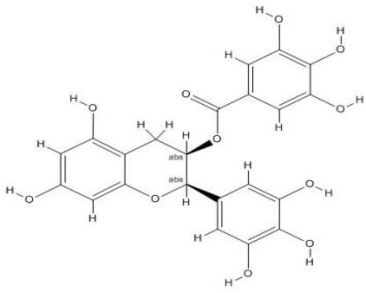
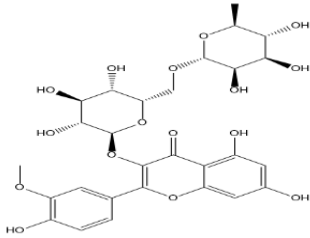
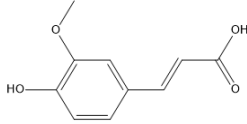
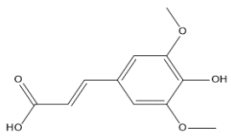
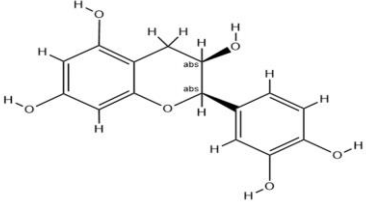
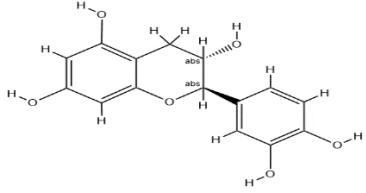
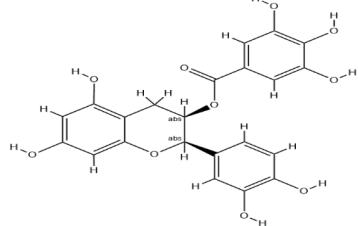
Çizelge 3.2.(devam)

1794427	Chlorogenic acid	
637542	P-coumaric acid	
444539	Cinnamic acid	
6508	Quinic acid	
10095180	Kaempferol hexoside	
5281672	Myricetin	
5280343	Quercetin	

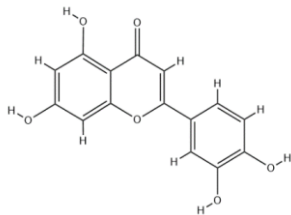
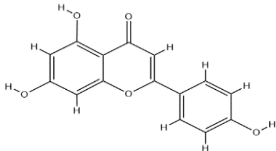
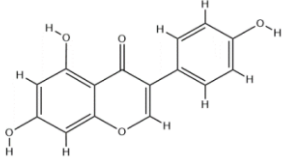
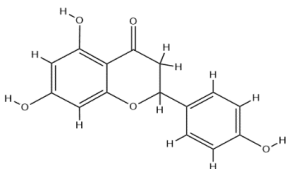
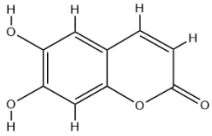
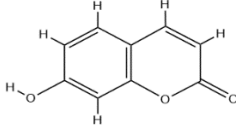
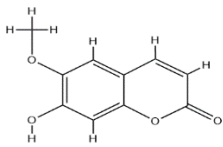
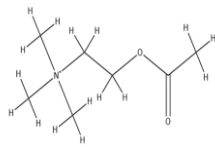
Çizelge 3.2. (devam)

5280804	Quercetin-3-glucoside	
5280805	Quercetin-3-rutinoside	
5281654	Isorhamnetin	
147774909 7	Kaempferol pentoside	
5280863	Kaempferol	

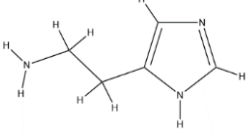
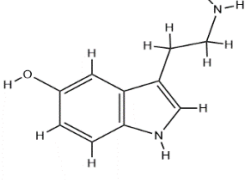
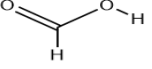
Çizelge 3.2. (devam)

65064	Epigallocatechin gallate	
133562525	Isorhamnetin rutinoside	
445858	Ferulic acid	
637775	Sinapic acid	
72276	Epicatechin	
9064	Catechin	
107905	Epicatechin gallate	

Çizelge 3.2. (devam)

5280445	Luteolin	
5280443	Apigenin	
5280961	Genistein	
932	Naringenin	
5281416	Esculetin	
5281426	Umbelliferone(7-hydroxycoumarin)	
5280460	Scopoletin	
187	Acetylcholine	

Çizelge 3.2. (devam)

774	Histamine	
5202	Serotonin	
284	Formic acid	

(Çizelge 3.2.) Bileşiklerin pubchem.ncbi.nlm.nih.gov adresi kullanılarak ID numaraları ve 2D yapıları hazırlanmıştır.

3.4.2. Moleküler yerleştirme

Çizelge 3.3. Ligand-protein etkileşimlerine ait yerleştirme enerjileri

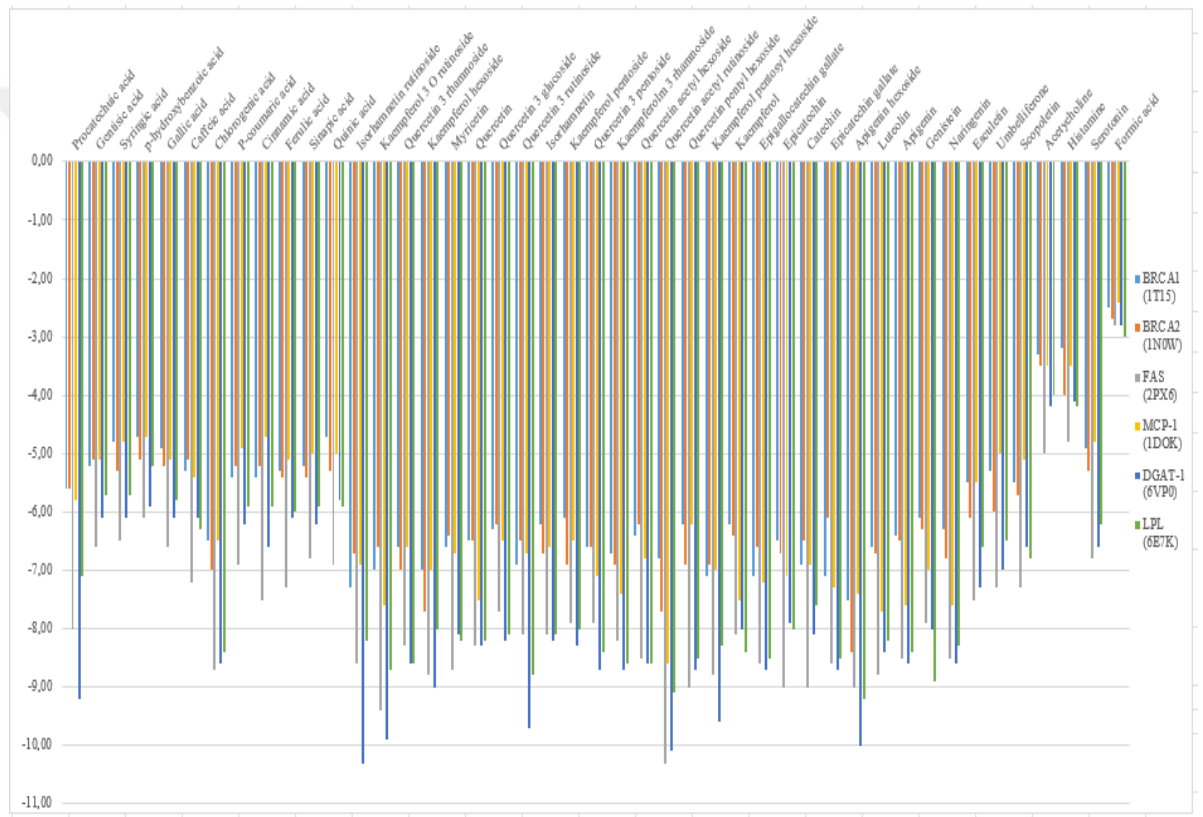
Proteinler	BRCA1 (1T15)	BRCA2 (1N0W)	FAS (2PX6)	MCP-1 (1DOK)	DGAT-1 (6VP0)	LPL (6E7K)
Ligandlar	Yerleştirme enerjisi (kcal/mol)					
Isorhamnetin rutinoside	-7.3	-6.7	-8.6	-6.9	-10.3	-8.2
Quercetin acetyl rutinoside	-6.8	-7.7	-10.3	-8.6	-10.1	-9.1
Apigenin hexoside	-7.5	-8.4	-9.0	-7.4	-10.0	-9.2
Kaempferol 3 O rutinoside	-7.0	-6.6	-9.4	-7.6	-9.9	-8.7
Quercetin 3 rutinoside	-6.9	-6.5	-8.1	-6.7	-9.7	-8.8
Kaempferol pentosyl hexoside	-7.1	-6.9	-8.8	-7.0	-9.6	-8.3
Procatechuic acid	-5.6	-5.6	-8.0	-5.8	-9.2	-7.1
Kaempferol hexoside	-7.0	-7.7	-8.8	-7.0	-9.0	-8.0
Quercetin 3 pentoside	-6.6	-6.6	-7.9	-7.1	-8.7	-8.4
Kaempferol 3 rhamnoside	-6.7	-6.9	-8.2	-7.4	-8.7	-8.6
Quercetin pentyl hexoside	-6.2	-6.9	-9.0	-6.2	-8.7	-8.5
Epigallocatechin gallate	-7.1	-6.6	-8.6	-7.2	-8.7	-8.5
Epicatechin gallate	-7.1	-6.1	-8.6	-7.3	-8.7	-8.5
Chlorogenic acid	-6.5	-7.0	-8.7	-6.5	-8.6	-8.4
Quercetin 3 rhamnoside	-6.6	-7.0	-8.3	-6.6	-8.6	-8.6
Quercetin acetyl hexoside	-6.4	-6.2	-8.5	-6.8	-8.6	-8.6
Apigenin	-6.4	-6.5	-8.5	-7.6	-8.6	-8.4
Naringenin	-6.3	-6.8	-8.5	-7.6	-8.6	-8.3
Luteolin	-6.6	-6.7	-8.8	-7.7	-8.4	-8.2
Quercetin	-6.5	-6.5	-8.3	-7.5	-8.3	-8.2
Kaempferol pentoside	-6.1	-6.9	-7.9	-6.5	-8.3	-8.0
Quercetin 3 glucoside	-6.3	-6.2	-7.7	-6.5	-8.2	-8.1
Isorhamnetin	-6.2	-6.7	-8.1	-6.6	-8.2	-8.1
Myricetin	-6.6	-6.4	-8.7	-6.7	-8.1	-8.2
Catechin	-6.9	-6.5	-9.0	-6.9	-8.1	-7.6

Çizelge 3.3. (devam)

Kaempferol	-6.2	-6.4	-8.1	-7.5	-8.0	-8.4
Genistein	-6.1	-6.3	-7.9	-7.0	-8.0	-8.9
Epicatechin	-6.5	-6.7	-9.0	-7.1	-7.9	-8.0
Esculetin	-5.5	-6.1	-7.5	-5.5	-7.3	-6.6
Umbelliferone	-5.3	-6.0	-7.3	-5.0	-7.0	-6.5
Cinnamic acid	-5.4	-5.2	-7.5	-4.7	-6.6	-5.9
Scopoletin	-5.5	-5.7	-7.3	-5.1	-6.6	-6.8
Serotonin	-4.9	-5.3	-6.8	-4.8	-6.6	-6.2
P coumaric acid	-5.4	-5.2	-6.9	-4.9	-6.2	-5.9
Sinapic acid	-5.2	-5.4	-6.8	-5.0	-6.2	-5.9
Gentisic acid	-5.2	-5.1	-6.6	-5.1	-6.1	-5.7
Syringic acid	-4.8	-5.3	-6.5	-4.8	-6.1	-5.7
Gallic acid	-4.9	-5.2	-6.6	-5.1	-6.1	-5.8
Caffeic acid	-5.3	-5.1	-7.2	-5.4	-6.1	-6.3
Ferulic acid	-5.3	-5.4	-7.3	-5.1	-6.1	-6.0
P-hydroxybenzoic acid	-4.7	-5.1	-6.1	-4.7	-5.9	-5.2
Quinic acid	-4.7	-5.3	-6.9	-5.0	-5.8	-5.9
Acetylcholine	-3.3	-3.5	-5.0	-3.5	-4.2	-4.0
Histamine	-3.2	-4.0	-4.8	-3.5	-4.1	-4.2
Formic acid	-2.5	-2.7	-2.8	-2.4	-2.8	-3.0

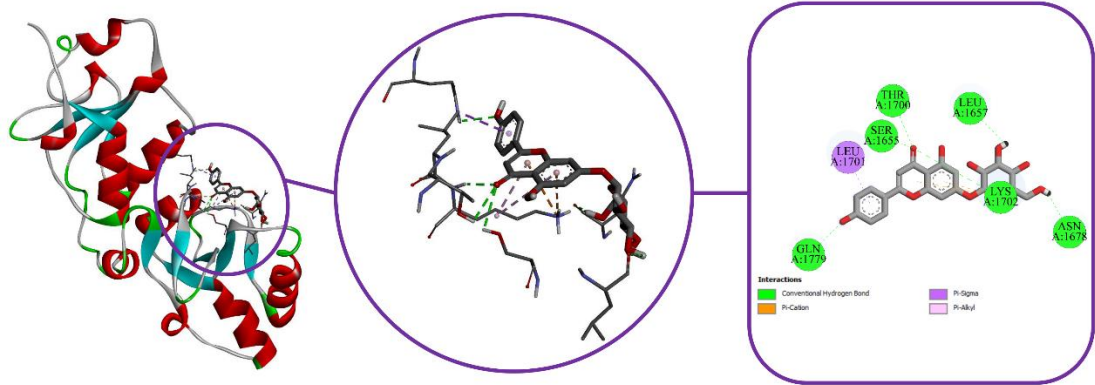
Yukarıdaki tabloda, literatüre dayalı olarak *U. dioica* bitkisinin içeriğinde yer aldığı bilenen 45 ligand ile qPCR deneyleri sonucunda istatistiki olarak anlamlı olduğu tespit edilen 6 proteinin moleküler yerleştirme uygulamaları sonucunda belirlenen yerleştirme enerji (kcal/mol) değerleri yer almaktadır (Çizelge 3.3.). Tablodaki değerler göz önünde bulundurulduğunda, bitki içerisinde yer alan bileşiklerin en çok DGAT-1 üzerine etkili olduğu, en az ise BRCA-1 üzerine etki gösterdiği tahmini yürütülmektedir. Ayrıca, ligandların; sırasıyla, Fasn, LPL ve MCP-1 proteinleri üzerine de yüksek seviyede etkili olduğu görülmektedir. Apigeninin hexoside isimli bileşik; BRCA1 (1T15) (Chakraborty vd., 2013; Muthusamy vd., 2011; Prabhavathi vd., 2021), BRCA-2 (1NOW) (M. K. A. Khan vd., 2018) ve LPL (6E7K) (Birrane vd., 2019) proteinleri üzerine, sırasıyla, -7.5 kcal/mol, -8.4 kcal/mol ve -9.2 kcal/mol yerleştirme enerjileriyle en etkili bileşik olarak belirlenmiştir. Fasn (2PX6) (Luna-

Vital vd., 2017) ve MCP-1 (1DOK) (Piccinini vd., 2010) proteinleri üzerine en etkili bileşik ise, sırasıyla, -10.3 kcal/mol ve -8.6 kcal/mol yerleştirme enerjileriyle quercetin acetyl rutinoside isimli bileşiktir. İsorhamnetin rutinoside isimli bileşik ise -10.3 kcal/mol yerleştirme enerjisiyle, DGAT-1 (6VP0) (Yu vd., 2021) proteini üzerine en etkili bileşik olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3.3.). Proteinler üzerine en fazla etki gösterdiği belirlenen bileşiklerin, protein yapılarıyla kurdukları etkileşimler grafikler halinde sunulmuştur. Ayrıca protein ve bileşiklerin birbirleriyle kurdukları etkileşim (Şekil 3.33.)’de gösterilmiştir.



Şekil 3.33. BRCA-1, BRCA-2, Fasn, MCP-1, DGAT-1 ve LPL proteinlerinin ligand ile eşleşmeleri sonucu aktivasyon değerleri

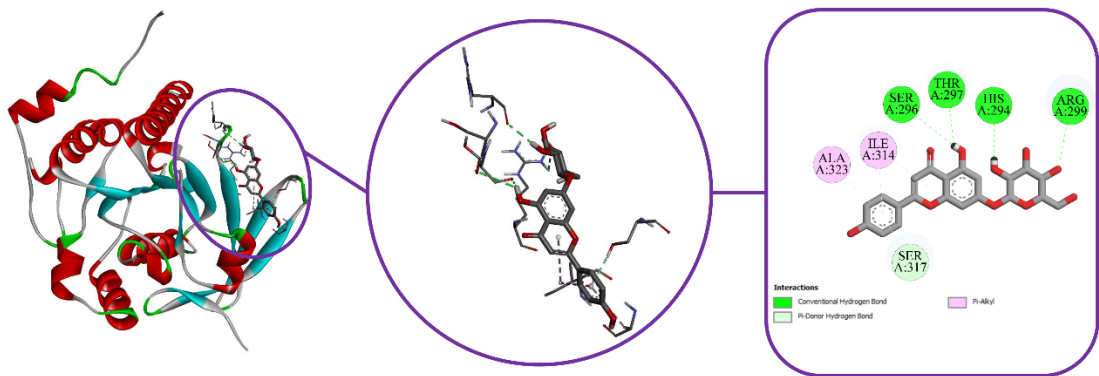
3.4.2.1. BRCA-1 (1T15) ve Apigenin hexoside etkileşimi



Şekil 3.34. Apigenin hexoside'nin BRCA-1 proteini ile etkileşimi

Bu pozdaki yerleştirme enerjisi -7.5 kcal/mol olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.3.). Apigenin hexoside, BRCA-1 proteininin yapısında yer alan SER A:1655, LEU A:1657, ASN A:1678, THR A:1700, LYS A:1702 ve GLN A:1779 amino asitleriyle hidrojen bağları kurmaktadır. Ayrıca, A zincirinin 1702 numaralı pozisyonunda yer alan LYS amino asiti ile Pi-kasyon etkileşimleri mevcuttur. A zincirinin 1701 numaralı pozisyonunda yer alan LEU amino asitiyle ise Pi-sigma ve Pi-alkil etkileşimlerinin olduğu gözlenmektedir (Şekil 3.34.).

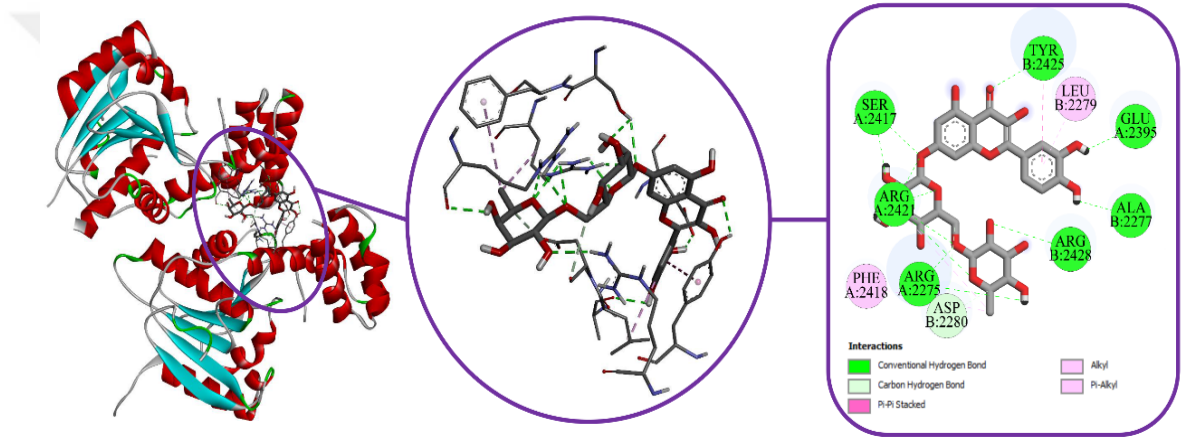
3.4.2.2. BRCA-2 (1NOW) ve Apigenin hexoside etkileşimi



Şekil 3.35. Apigenin hexoside'nin BRCA-2 proteini ile etkileşimi

Bu pozdaki yerleştirme enerjisi -8,4 kcal/mol olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.3.). Apigenin hexoside, BRCA-2 proteininin yapısında yer alan HIS A:294, SER A:296, THR A:297 ve ARG A:299 amino asitleriyle hidrojen bağları ve SER A:317 ile de Pi-donor hidrojen bağları kurmaktadır. Ligand ve protein arasındaki Pi-alkil etkileşimleri ise ILE A:314 ve ALA A:323 amino asitleriyle kurulmaktadır. (Şekil 3.35.).

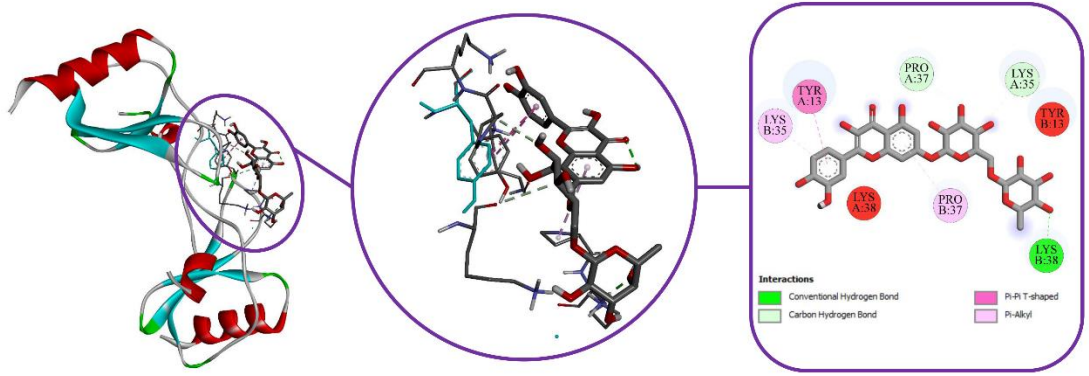
3.4.2.3.FAS (2PX6) ve Quercetin acetyl rutinoside etkileşimi



Şekil 3.36. Quercetin acetyl rutinoside'nin Fasn proteinini ile etkileşimi

Bu pozdaki bağlanma enerjisi, -10,3 kcal/mol olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.3.). Quercetin acetyl rutinoside, Fasn proteininin yapısında yer alan ARG A:2275, SER A:2417, ARG A:2421, GLU A:2395, ALA B:2277, TRY B:2425 ve ARG B:2428 amino asitleriyle hidrojen bağları ve ASP B:2280 ile de karbon-hidrojen bağı kurmaktadır. Ligand ve TRY B:2425 amino asiti arasında π - π istiflenmesi görülmektedir. Ayrıca, LEU A:2279 ve PHE A:2418 amino asitleriyle quercetin acetyl rutinoside bileşiği arasında Pi-alkil etkileşimleri mevcuttur. Protein ile ligand arasında kurulan hidrojen bağlarının çokluğu yerleştirme enerjisinin çok düşük hesaplanmasında temel faktördür (Şekil 3.36.).

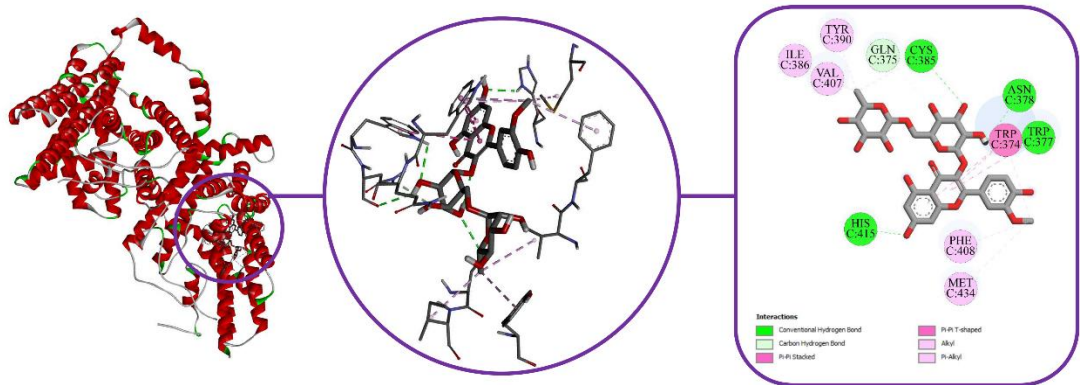
3.4.2.4. MCP-1 (1DOK) ve Quercetin acetyl rutinoside etkileşimi



Şekil 3.37. Quercetin acetyl rutinoside'ın MCP-1 proteini ile etkileşimi

Bu pozdaki yerleştirme enerjisi, -8.6 kcal/mol olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.3.). Quercetin acetyl rutinoside, MCP-1 proteininin yapısında yer alan LYS B:28 amino asiti ile hidrojen bağı, LYS A:35 ve PRO A:37 amino asitleriyle de karbon-hidrojen bağı kurmaktadır. Ligand ve TRY A:13 amino asiti arasında π - π istiflenmesi görülmektedir. Ayrıca, LYS A:35 ve PRO B:37 amino asitleriyle quercetin acetyl rutinoside bileşiği arasında Pi-alkil etkileşimleri mevcuttur (Şekil 3.37.).

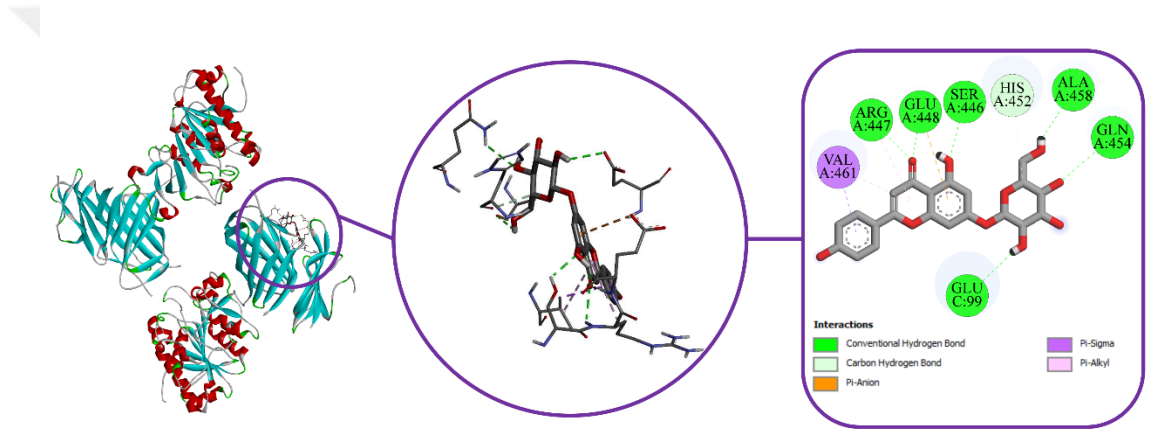
3.4.2.5. DGAT-1 (6VP0) ve Isorhamnetin rutinoside etkileşimi



Şekil 3.38. Isorhamnetin rutinoside'ın DGAT-1 proteini ile etkileşimi

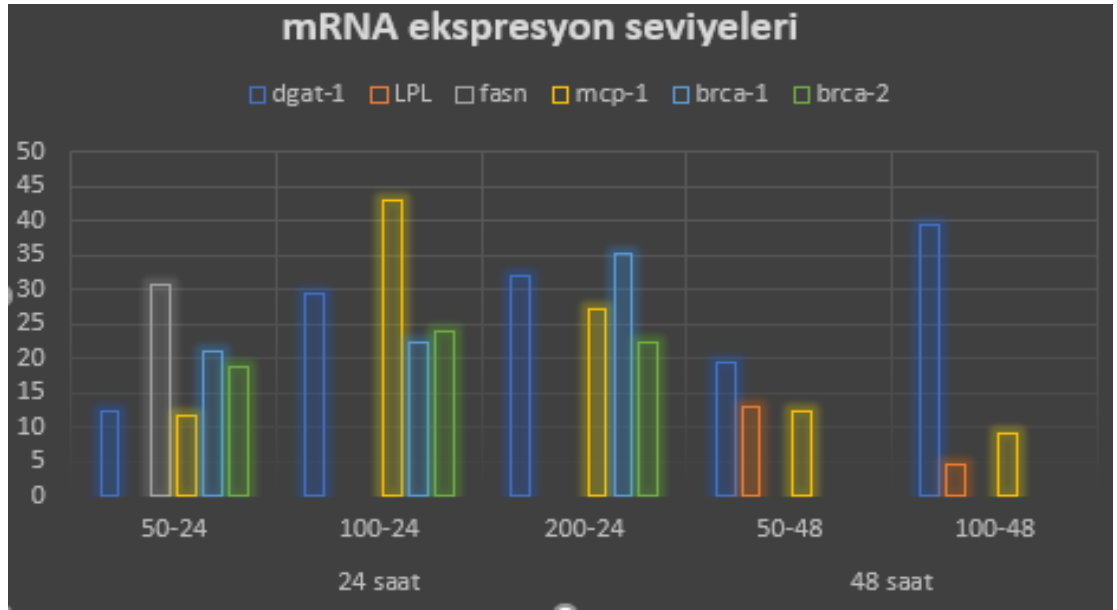
Bu pozdaki yerleştirme enerjisi, -10.3 kcal/mol olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.3.). Isorhamnetin rutinoside isimli ligand, DGAT-1 proteininin yapısında yer alan TRP C:377, ASN C:378, CYS C:385 ve HIS C:415 amino asitleri ile hidrojen bağı, GLN C:375 amino asitiyle de karbon-hidrojen bağı kurmaktadır. Ligand ile TRP C:374 ve TRP C:377 amino asitleri arasında π - π istiflenmesi görülmektedir. Ayrıca, ILE C:386, TRY C:390, VAL C:407, PHE C:408 ve MET C:434 amino asitleriyle ligand arasında Pi-alkil ve alkil etkileşimleri de gözlemlenmiştir (Şekil 3.38.).

3.4.2.6. LPL (6E7K) ve Apigenin hexoside etkileşimleri



Şekil 3.39. Apigenin hexoside'nin LPL proteini ile etkileşimi

Bu pozdaki yerleştirme enerjisi, -9.2 kcal/mol olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.3.). Apigenin hexoside isimli ligand, LPL proteininin yapısında yer alan SER A:446, ARG A:447, GLU A:448, GLN A:454, ALA A:458 ve GLU C:99 amino asitleri ile hidrojen bağları, HIS A:452 amino asitiyle de karbon-hidrojen bağı kurmaktadır. Ligand ile GLU A:448 amino asiti arasında Pi-anyon etkileşimi görülmektedir. VAL A:461 amino asityle ligand arasında Pi-sigma etkileşimi oluşurken, VAL A:461 ve ARG A:447 amino asitleriyle ligand arasında Pi-alkil etkileşimleri gözlemlenmiştir (Şekil 3.39.).



Şekil 3.40. LPL, MCP-1, BRCA-1, BRCA-2, Fasn, DGAT-1 primerlerinin DM+LPS'e göre oranlandıklarında (DM+LPS/100) yüzdelik değerleri

Yukarıdaki grafikte (Şekil 3.40.)'da qPCR sonuçlarına göre LPL geninin %4 oranı ile en düşük ekspresyona sahiptir. MCP-1 geni, %9'luk oran ile ikinci en düşük aktivasyona sahiptir. DGAT-1 geni ise %12'lik oran ile 3. en düşük ekspresyona sahiptir, ardından BRCA-1 %18, BRCA-2 ise %21'lik oranla 4. ve 5. sırada yer almaktadır. Fasn geni ise %30'luk oranla en yüksek ekspresyon seviyesine sahiptir ve 6. Sırada yer alır.

3.5. TARTIŞMA

Obezite tüm dünyada yayılım gösteren inflamatuvar bir hastalıktır. Epigenetik, genetik, fizyolojik, davranışsal, sosyokültürel ve çevresel pek çok fizyopatolojik etmen obezite gelişimine zemin hazırlar. Enerji dengesinin düzenlenmesi ve yağ depolarının oluşmasından biyolojik ortam (genetik, epigenetik) ile çevresel faktörler (davranışsal/ sosyal etmenler, kronik stres) arasındaki etkileşimler yer almaktadır. Kültürel, davranışsal ve çevresel etmenler (enerji-yoğun beslenme, büyük porsiyonlar, fiziksel inaktivite, sedanter yaşam tarzı) ve buna ek olarak yemek yeme alışkanlıkları obezite gelişimini hızlandırmaktadır (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2018). Obezite meme kanseri, tip-2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok kronik hastalığın ilerlemesini de teşvik etmektedir. Obezite ve meme kanserinin tedavisinde cerrahi yöntemler veya kemoeterapik ilaçlar kullanılmaktadır. Bu mevcut yöntemler ekonomi açısından maliyetlidir hem de kesin sonuçlar vermemektedir. Cerrahi ve kemoterapik yöntemler hastalarda kusma, bulantı, iştahsızlık gibi yan etkilerinden dolayı sorun oluşturmaktadır. Kanser için kullanılan ilaçlar da çok maliyetlidir ve ülkenin ekonomik durumuna zarar vermektedir. Dünyada ve ülkemizde giderek artış gösteren obezite ve obeziteye bağlı meme kanseri riski, araştırmacıları alternatif tedavi yöntemleri bulmaya yöneltmiştir. Bu alternatif tedavi yöntemlerinin en başında tıbbi bitkiler yer almaktadır. Tıbbi bitkiler ilk çağlardan beri hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olup ayrıca insanlığın gelişiminde de çok önemli bir yere sahiptir. Bu tür bitkilerin sağlık üzerine etkilerinin araştırılması yeni ilaçların keşfi ve tasarımı için oldukça önem arz etmektedir (Rabia vd., 2019).

U. dioica 'nın obezite, şeker düşürücü, ödem attırıcı, saç dökülmesi, romatizmal hastalıklar gibi birçok hastalıkların tedavisinde halk tarafından kullanılmaktadır. Mohammadi (2019) tarafından yapılan *in vitro* bir çalışmada *U. dioica* 'nın MDA-MB-48 meme kanseri hücre hattı ve normal hücre hattında denendiği ve Bcl-2, kaspaz-3 kaspaz-9 sinyal yollarının aktivitesini azalttığı çalışmalarıyla kanıtlanmıştır. *U. dioica* bitkisi *Urticacea* ailesinden olup insan sağlığı üzerine yararlı etkilere ve büyük oranda biyolojik aktiviteye sahiptir. Bitkinin yararlı etkileri antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antihiperglisemik, antioksidananti-viral özellikleri içerir (Rabia vd, 2019). Bitkinin ayrıca farmakolojik araştırmalar ve tıbbi açıdan önemi günden güne

artmaktadır (Otles ve Yalcin, 2012). *U. dioica* kök ve tohumla çoğalan, yaprakları ve gövdesi yakıcı tüylerle kaplı olan dünya genelinde dağılım gösteren yabani bir ot türüdür (Tello vd., 2008). *U. dioica* önemli ölçüde terpenoidler, karatonoidler, yağ asitleri, aminoasitler, klorofil, vitaminler, tanenler, streoidler gibi aktif bileşenler içermektedir (Kregiel vd. 2018). Rabia ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada *U. dioica*'nın kansere karşı koruyucu etkisi olup, antiproliferatif etkisiyle tümör büyümesini yavaşlatıp kanseri tedavi ettiği belirtilmektedir. Bitkinin içerisinde yer alan vitamin B3 ve resercinal gibi bileşenleri anti-inflamatuvar özelliğe sahip olması nedeniyle siklooksijenaz (COX-1 ve COX-2) enzimlerinin inhibasyonunu sağlamaktadır. Tümör gelişimine yardımcı olan sitokinlerin çoğu NF-KB transkripsiyon faktörleri aracılığıyla aktif hale getirilir veya öncü kanser hücrelerde ve immün/inflamatuvar hücrelerinde NF-KB sinyalleşmesini stimüle etmektedir. Literatürdeki bir çalışmada *U. dioica* ekstraktının oksidatif stres ile indüklenen nükleer faktör-kappa B'nin (NF- κ B) aktivasyonunu inhibe ederek bir anti-enflamatuvar etki gösterdiğini belirtmiştir (Erzurum, 2016). Ayrıca bitkinin içerisindeki 45 bileşik literatüre dayalı olarak bulunmuş (Çizelge 3.3.) ve yapmış olduğumuz moleküler doking çalışmasında kullanılmıştır (Repajić vd., 2021).

Obezite, viseral (iç organlarla ilgili) ve subkutan (deri altı doku) yağ dokuda subklinik inflamasyona yol açar. Bu inflamasyon, nekrotik (doku ölümü) adipositlerle karakterizedir. Bu subklinik inflamasyon meme kanseri riskini arttırabilir. Yağ dokusundan açığa çıkan faktörler, nükleer faktör kappa B (NFkB) ile sinyal iletili ve transkripsiyon-3 aktivatörü gibi anahtar inflamatuvar molekülleri (STAT3) aktive etmektedir. Yağ dokusundaki NFkB'nin aktivasyonu daha sonra siklooksijenaz-2 (COX-2), tümör nekrozu faktörü- α (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) gibi birkaç proinflamatuvar aracının ekspresyonunu arttırabilir (Erzurum, 2016). *U. dioica*'nın kumarin türevi bileşenleri ise anti-inflamatuvar ve anti-kanser birimlerine katkı sağlamaktadır (Korkmaz vd., 2010). *U. dioica*'nın *in vitro* yapılan bir çalışmasında ekstraktın diklorometan özütü ile meme kanseri hücre hattında mRNA seviyesinde transkripsiyonel düzeyde azaltıcı etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Mohammadi vd. 2016). *U. dioica* sebze olarak tüketildiğinde obeziteye karşı koruduğu fareler üzerinde yapılan *in vivo* çalışmalarla desteklenmiştir (Fan vd. 2020). Bir başka çalışmada *U. dioica* ekstraktı kullanılarak yapılan tedavi ile obezitenin neden olduğu insülin direncini azalttığı tespit edilmiştir (Obanda vd. 2016).

Meme kanseri ve obezite birlikte ele alındığında inflamasyonu arttırıcı bir etkiye sahiptir. İnflamasyonla ilişkili olarak interlökin-6 (IL-6) ve leptin, adipoz doku tarafından üretilmektedir ve bunun sonucunda proanjyogenik olarak görev yapar ve her ikisi de meme kanseri üzerinde inflamatuvar ve mitoz bölünmeyi arttırıcı etkiye sahiptir. Leptin de yağ dokudan salgılanır ve leptinin seviyesindeki artış obezite ve meme kanseriyle ilişkilidir ve fazla olması durumunda hücre yüzeyi reseptörüne bağlanır ve JAK2/STAT3 yolağı, PI3K/AKT yolağı ve MAPK yolağı gibi birkaç onkojeni (normal hücreyi kanserli hücreye dönüştüren) yolağın aktivasyonuna neden olur (Korkmaz vd., 2010). Buna bağlı olarak yapılan bir çalışmada obezite kaynaklı meme kanserinde inflamasyonla ilişkili markör olan IL-6'nın ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Inclo vd., 2018). Leptin, IL-6, CRP gibi inflamatuvar markörler, zayıf prognozu olan meme kanseri hastalarında yüksek düzeyde saptanır (Iyengar vd., 2013).

Babaei (2015) tarafından yapılan *in vivo* çalışmada meme kanseri olan obez bireylerde leptin, IL-6 ve CRP seviyelerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada; obez olanların leptin ve CRP seviyeleri, normal beden kitle indeksine sahip olan hastalardan önemli derecede yüksek olup, IL-6 seviyelerinde ise anlamlı fark saptanmamıştır. Bu konuda yapılan bir meta-analiz çalışmasında, artan BKİ ile meme kanseri arasında pozitif yönlü zayıf bir kolerasyon saptanmıştır (Renehan, 2008). Lipolisakkarit (LPS) gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunur ve inflamasyonu önemli derecede arttırıcı etkiye sahiptir. Quintero ve ark. (2013) yapmış olduğu bir çalışmada LPS ile uyarılan adiposit 3T3-L1 hücrelerinde inflamasyonla ilişkilendirilen proinflamatuvar genler, IL-6, TNF- α ve MCP-1 ekspresyonundaki artışı engellemiştir ve adipositlerde LPS'in neden olduğu iltihaplanmada rol oynayan ERK1 / 2'nin fosforilasyonu, bitki ile (allinin) tedavisinin ardından azalmıştır. Takayuki ve ark. (2004) tarafından yapılan *in vivo* bir çalışmada TNF- α , LPS ile indüklenen karaciğer hasarını arttırmıştır ve adiponektin ile tedavisinden sonra TNF-a'nın ekspresyonunu azaltarak LPS kaynaklı hasarı iyileştirmiştir. Matthias (2008) tarafından yapılan *in vivo* çalışmada obez bireylere (1 mg/ml) LPS uygulanan yağ dokusunda IL-6, IL-2, TNF- α sitokinlerinin artışı gözlenmiştir. Chung ve ark. (2012) yapmış olduğu *in vitro* çalışmada preadiposit yapıdan adiposit kültürlerine LPS uygulanmasından 3 saat sonra, IL-6, IL-2, TNF- α markörlerinin mRNA'larının indüksiyonu adipositlere göre belirgin şekilde artmıştır. Literatürde Kregiel ve ark. (2018) yapmış olduğu bitki ile yapılan birçok çalışma

mevcuttur ve bitki derinlemesine incelenmiştir. Obeziteye bağlı meme kanseri riskinin artışında birçok çalışma olup henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Ancak Bahsi ve ark. (2018) yapmış olduğu meme kanserine yatkınlık yaratan mutasyonlar BRCA-1 ve BRCA-2 genleri olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir.

Obez grupta sağlıklı grupla kıyasla vücut ağırlığı artışı ve lipit akümüasyonu artışı, serum trigliserit seviyesinde ve serbest yağ asitlerinde artış gözlemlenmiştir. *U. dioica* ekstraktı verilen grupta farelerin vücut ağırlığının anlamlı bir şekilde düştüğü gözlemlenmiştir. Serbest yağ asitlerini ve lipit akümüasyonu seviyesini *U. dioica* ekstraktı uygulamasının düşürdüğü rapor edilmiştir (Obanda vd., 2016).

Bizim çalışmamızda da 3T3-L1 adipositlerde uygulamasının, IL-6'nın ekspresyon seviyesini istatistiki olarak anlamlı olmasa da düşürdüğü belirlenmiştir bu açıdan kıyaslanınca çalışmalar birbirine paralel seyretmektedir. Literatürdeki çalışmalarda adipositeyle ve lipit akümüasyonu ilişkili olarak LPL, Fasn ve DGAT-1 geninin ekspresyonunda bir artış saptamıştır. Bizim çalışmamızda bu üç genin ekspresyonunda artış saptanmış ve bitki ekstraktı uygulamasının ardından anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar, meme kanseri hücre hattında artış gösteren BRCA-1, BRCA-2 ve HER-2 genini tespit etmiştir. Çalışma, *U. dioica*'nın meme kanserine ilişkin olan genlerini iyileştirici etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda da istatistiki olarak anlamlı bulunmasa da HER-2 geninin adipositeyle artan mRNA ekspresyonunun *U. dioica* ekstraktı uygulamasıyla düştüğü belirlenmiştir.

Tüm bu çalışmalar ve bilgiler doğrultusunda, bu çalışmada obeziteyle, meme kanseriyle ve inflamasyonla ilişkili bulunan 8 markörün 3T3-L1 adipositlerinde taranması sağlanmıştır. Tarama yapılması için pre-adiposit kontrol, adiposit kontrol ve farklı dozlarda bitki ekstraktı uygulanmış adiposit grupları oluşturulmuştur. Daha sonra bu gruplardan elde edilen örneklerle qPCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Veriler doğrultusunda ise trigliseritlerin biyosentezinde rol oynayan ve DGAT-1 geninin adipositeyle yükseldiği ve *U. dioica*'nın farklı dozlarda ekstaktlarının bunu istatistiki olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü görülmüştür. Bu çalışmada trigliseritleri yağ asitleri ve gliserole çeviren diğer bir enzim olarak bilinen LPL'in adipositeyle arttığı ve bu artışın bitki ekstraktı uygulamasıyla birlikte istatistiki olarak düşürdüğü gözlenmiştir. Elde edilen veriler *U. dioica* ile daha önceden yapılan

çalışmaları destekleyici niteliktedir. Literatürde (Repajić vd., 2021) tarafından yapılan bir çalışmada *U. dioica* 'nın içerisinde yer alan 45 bileşiğin ligand yapısı hazırlanmıştır. Isırgan otu yaprak ve saplarında en çok bulunan polifenollerin büyükten küçüğe sıralanaşı; GM 179,22 mg 100 g⁻¹ dm sinamik asitler> flavonoller (GM 134,60 mg 100g⁻¹ dm) >flavonlar (GM 24,56 mg 100 g⁻¹ dm)> flavan-3-ols (GM 20,70 mg 100 g⁻¹ dm)> benzoik asitler (GM 10,20 mg 100 g⁻¹dm). Kumarinler>izoflavonlar >diğer asitler daha düşük konsantrasyonlarda mevcuttur. GM değerleri sırasıyla 5.31, 3.09 ve 2.88 mg 100 g⁻¹ dm, en az temsil edilen polifenol grubu ise flavanonlardır (GM 0.34 mg 100 g⁻¹ dm). Çalışmamızda istatistiki açıdan anlamlı olarak nitelendirdiğimiz 6 gen içinde protein yapısı hazırlanmıştır. Ligand-reseptör ilişkisine dayalı olarak moleküler doking işlemi gerçekleştirilmiştir. Veriler doğrultusunda enerjisi en az olanın en iyi aktivasyona sahip olduğu (Çizelge 3.3.) gösterilmiştir. BRCA-1 (1T15) proteini apigeninin hexoside ligandı ile -7,5 (kcal/mol) aktivasyon değerine sahiptir. Apigenin hexoside, flavones grubuna ait bir bileşendir ve literatürde GC/MS sonuçlarına göre GM 24.56 mg 100 g⁻¹dm çıkmıştır. BRCA-2 (1NOW) proteini apigeninin hexoside ligandı ile -8,4 (kcal/mol) aktivasyon değerine sahiptir. Apigenin hexoside, flavones grubuna ait bir bileşendir ve literatürde GC/MS sonuçlarına göre GM 24.56 mg 100 g⁻¹dm çıkmıştır (Repajić vd., 2021). Fasn (2PX6) proteini quercetin acetyl rutinoside ligandı ile -10,3 (kcal/mol) ile en iyi aktivasyon değerine sahiptir. Quercetin acetyl rutinoside flavonols grubuna ait bir bileşendir ve literatürde GC/MS sonuçlarına göre GM 134.60 mg 100 g⁻¹dm çıkmıştır (Repajić vd., 2021). Literatürde en çok miktarda flavonols grubu yer almaktadır. Bu sonuca göre fazla miktara sahip olan bileşenin aktivasyonunun iyi olduğu söylenebilir. MCP-1 (1DOK) proteini quercetin acetyl rutinoside ligandı ile -8,6 (kcal/mol) ile en iyi aktivasyon değerine sahiptir. Quercetin acetyl rutinoside flavonols grubuna ait bir bileşendir ve literatürde GC/MS sonuçlarına göre GM 134.60 mg 100 g⁻¹dm çıkmıştır. DGAT-1 (6VP0) proteini isorhamnetin rutinoside ligandı ile -10,3(kcal/mol) ile en iyi aktivasyon değerine sahiptir. Isorhamnetin rutinoside, flavonols grubuna ait bir bileşendir ve literatürde GC/MS sonuçlarına göre GM 134.6 mg 100 g⁻¹dm çıkmıştır. Bu durumda da bitkinin içeriğinde fazla bulunan bileşenin, protein ile aktivasyonunun en iyi değere sahip olduğu söylenebilir. LPL (6E7K) proteini, apigenin hexoside ligandı ile -9,2 (kcal/mol) aktivasyon değerine sahiptir. Apigenin hexoside, flavones grubuna ait bir

bileşendir ve literatürde GC/MS sonuçlarına göre GM 24.56 mg 100 g⁻¹dm çıkmıştır. Bileşenin miktarı düşük olmasına rağmen LPL proteini ile iyi aktivasyon göstermiştir. qPCR ve moleküler doking çalışmalarının birbiriyle kıyaslayacak olursak; Moleküler doking sonucuna göre (Çizelge 3.3.)’de Fasn (2PX6) proteini -10.3 (kcal/mol) değer ile en iyi aktivasyona sahiptir. Ancak qPCR sonucuna göre en az düşürücü (%30) etkiye sahiptir. DGAT-1 geninin q-PCR sonucu değerlendirildiğinde adipositeyi düşürerek %12’lik bir ekspresyon seviyesine indirmiştir. Moleküler doking sonucuna göre DGAT-1 (6VPO) proteini -10,3 (kcal/mol) değer ile en iyi aktivasyonu göstermiştir. Bu durumda DGAT-1 transkripsiyonel düzeyde adiposite oranını iyi düşürdüğü ve moleküler doking sonucuna göre en iyi aktivasyona sahip olduğu söylenebilir. İkinci en iyi aktivasyon değerine sahip LPL (6E7K) proteini -9,2 (kcal/mol) oranla yerini almaktadır. LPL geni qPCR sonucuna göre adiposite oranını transkripsiyonel düzeyde en çok düşüren gen olmuştur ve moleküler doking çalışmasında aktivasyonu yüksek çıkmıştır bu durumda LPL geni için yapılan iki çalışmada birbirini destekler niteliktedir. Bir başka protein MCP-1(1DOK) ise -8,6 (kcal/mol) ile diğerleriyle kıyaslanırsa 4. Sırada en iyi aktivite değerine sahiptir. Transkripsiyonel düzeyde ise adipositeyi %91 oranında düşürerek %9 ekspresyona sahiptir. MCP-1 proteini içinde her iki sonuç birbirini desteklemektedir. BRCA-1 (1T15) ve BRCA-2(1NOW) proteinin apigenin hexoside ile aktivasyon değerleri sırasıyla -7,5 (kcal/mol) ve -8,4 (kcal/mol) değer ile en düşük aktivasyonlara sahiptir. BRCA-1/BRCA-2 geni adiposite oranını transkripsiyonel düzeyde %80 bir değerle düşürerek %20 oranında bir ekspresyona sahiptir. BRCA-1 ve BRCA-2 proteini içinde sonuçlar birbirini destekler nitelikte olup, sadece Fasn (2PX6) proteini transkripsiyonel düzeyde ekspresyonu en az düşürmesine rağmen en iyi aktivasyona sahip olarak karşımıza çıkmaktadır.

4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar doğrultusunda *U. dioica* ekstraktının anti-inflamatuar, anti obezite ve anti-kanser arttırıcı etkisi olduğu bilinmektedir. Bitkinin bu iyileştirici özelliklerinin ve içerisinde yer alan bileşiklerin hangi moleküler yolları etkileyerek sağladığı halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan bu çalışmada obezite ve obezite durumunda artış gösteren inflamasyon ve meme kanseriyle paralel olan meme kanseri, adiposite ve inflamasyon ile ilgili gen bölgelerinin taranması ve *U. dioica* 'nın bu gen bölgelerinin ekspresyonunda etkili olup olmadığının gözlemlenmesi sağlanmıştır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda BRCA-1, BRCA-2, DGAT-1, LPL, Fasn ve MCP-1 için obezitenin hücresel anlamda artışına neden olan adipositeyle artış gösteren ekspresyonun, *U. dioica* uygulaması (50-100-200 µg/ml) ile artış gösteren ekspresyonu düşürdüğü saptanmıştır.

Ayrıca çalışmada, moleküler yerleştirme çalışmaları yapılarak taradığımız 6 markörlerin birbiriyle ilişkisi incelenmiştir ve bitki uygulamasının ardından içerisindeki bileşenlerin 6 proteinle olan aktivasyonu belirlenmiştir.

Hücresel düzeyde *in vitro* çalışmalarla elde edilen bu veriler *in vivo* çalışmalarla desteklenerek bitkinin obezite ve buna bağlı ortaya çıkan rahatsızlıkları etkileme mekanizması anlaşılabilceği düşünülmektedir. Ayrıca başka gen ve hücre hatlarıyla yapılan *in vitro* çalışmalarla moleküler mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sağlanabilir. Çalışmanın devamında protein düzeyinde translasyonel bir çalışma yapılarak, elde edilen veriler desteklenebilir.

KAYNAKÇA

- Akalın, M.K., S. Karagöz, & M. Akyüz. (2013). Application of response surface methodology to extract yields from stinging nettle under supercritical ethanol conditions. *The Journal of Supercritical Fluids*, 84, 164-172.
- Alim, E.N. (2016). *Meme kanseri oluşumunda obezitenin ve beslenmeye bağlı risk faktörlerinin belirlenmesi*, Uzm. Dyt. Tez, Başkent Üniversitesi, Ankara, 158s.
- Babaei, Z., D. Moslemi, H. Parsian, S. Khafri, M. Pouramir, & A. Mosapour. (2015). Relationship of obesity with serum concentrations of leptin, CRP and IL-6 in breast cancer survivors. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 27(4), 223-229.
- Bhardwaj, P., C.C. Au, A. Benito-Martin, H. Ladumor, S. Oshchepkova, R. Moges, & K.A. Brown. (2019). Estrogens and breast cancer: Mechanisms involved in obesity-related development, growth and progression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 189, 161-170.
- Birrane, G., A.P. Beigneux, B. Dwyer, B. Strack-Logue, K.K. Kristensen, O.L. Francone, L.G. Fong, H.D. Mertens, C.Q. Pan, & M. Ploug. (2019). Structure of the lipoprotein lipase–GPIHBP1 complex that mediates plasma triglyceride hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1723-1732.
- Chakraborty, A., A. Katarkar, K. Chaudhuri, A. Mukhopadhyay, & J. Basak. (2013). Detection of a novel mutation in exon 20 of the BRCA1 gene. *Cellular & molecular biology letters*, 18(4), 631-638.
- Chen, H.C., S.J. Stone, P. Zhou, K.K. Buhman, & R.V. Farese. (2002). Dissociation of obesity and impaired glucose disposal in mice overexpressing acyl coenzyme a: diacylglycerol acyltransferase 1 in white adipose tissue. *Diabetes*, 51(11), 3189-3195.
- Çevik, C. (2020), Ankara Akupunktur ve Tamamlayıcı Tıp Dergisi, 7-2, Ankara,87
- Crespi, E., G. Bottai, & L. Santarpia. (2016). Role of inflammation in obesity-related breast cancer. *Current opinion in pharmacology*, 31, 114-122.
- Doolittle, M.H., O. Ben-Zeev, J. Elovson, D. Martin, & T.G. Kirchgessner. (1990). The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 265(8), 4570-4577.

- Erzurum, A. N. (2016) ‘ ‘*Meme Kanseri Oluşumunda Obezitenin ve Beslenmeye Bağlı Risk Faktörlerinin Belirlenmesi* ‘ ‘, Phd.T hesis, Başkent Üniversitesi, Ankara.
- Esposito, S., A. Bianco, R. Russo, A. Di Maro, C. Isernia, & P.V. Pedone. (2019). Therapeutic perspectives of molecules from *Urtica dioica* extracts for cancer treatment. *Molecules*, 24(15), 2753.
- Fattahi, S., A.M. Ardekani, E. Zabihi, Z. Abedian, A. Mostafazadeh, R. Pourbagher, & H. Akhavan-Niaki. (2013). Antioxidant and apoptotic effects of an aqueous extract of *Urtica dioica* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(9), 5317-5323.
- Fu, H.Y., S.J. Chen, R.F. Chen, W.H. Ding, L.L. Kuo-Huang, & R.N. Huang. (2006). Identification of oxalic acid and tartaric acid as major persistent pain-inducing toxins in the stinging hairs of the nettle, *Urtica thunbergiana*. *Annals of botany*, 98(1), 57-65.
- Gül, Ç. (2019), *Mersin bölgesinde yetişen hypericum perforatum L.(kantaron), Urtica dioica L. (ısırgan otu) ve lavandula officinalis (lavanta) bitkilerinden süperkritik ekstarksiyon yöntemiyle elde edilen özütlerin antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi*, M.Sc. Tez, Mersin Üniversitesi, Mersin 66s.
- Hoch, M., A.N. Eberle, R. Peterli, T. Peters, D. Seboek, U. Keller, B. Muller, & P. Linscheid. (2008). LPS induces interleukin-6 and interleukin-8 but not tumor necrosis factor- α in human adipocytes. *Cytokine*, 41(1), 29-37.
- Hojnik, M., M. Škerget, & Ž. Knez. (2007). Concentrating the chlorophylls in extract by pretreatment of stinging nettle leaves with nonpolar organic solvents and supercritical carbon dioxide. *Journal of food process engineering*, 30(6), 701-716.
- Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, & B.M. Spiegelman. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259(5091), 87-91.
- Howe, L.R., K. Subbaramaiah, C.A. Hudis, & A.J. Dannenberg. (2013). Molecular pathways: adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer. *Clinical cancer research*, 19(22), 6074-6083.
- Huang, S.-Y., & X. Zou. (2010). Advances and challenges in protein-ligand docking. *International journal of molecular sciences*, 11(8), 3016-3034.
- Joshi, B.C., M. Mukhija, & A.N. Kalia. (2014). Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 8(4).

- Khan, M.K.A., S. Akhtar, & J.M. Arif. (2018). Structural Insight into the mechanism of dibenzo [a, l] pyrene and Benzo [a] pyrene-mediated cell proliferation using molecular docking simulations. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 10(4), 653-673.
- Khan, S., S. Shukla, S. Sinha, & S.M. Meeran. (2013). Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: therapeutic targets. *Cytokine & growth factor reviews*, 24(6), 503-513.
- Kim, C., H. Park, T. Kawada, J.H. Kim, D. Lim, N. Hubbard, B. Kwon, K.L. Erickson, & R. Yu. (2006). Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *International journal of obesity*, 30(9), 1347-1355.
- Kohler, B.A., R.L. Sherman, N. Howlader, A. Jemal, A.B. Ryerson, K.A. Henry, F.P. Boscoe, K.A. Cronin, A. Lake, & A.-M. Noone. (2015). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2011, featuring incidence of breast cancer subtypes by race/ethnicity, poverty, and state. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(6).
- Korkmaz F. (2010). *Isırgan Otu (Urtica Dioica) Ekstresinin Kolon Kanseri Hücre Serileri Üzerindeki Apoptotik, Antiproliferatif ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması*, M.Sc. Tez, Ankara Üniversitesi, Ankara 72s.
- Kregiel, D., E. Pawlikowska, & H. Antolak. (2018). *Urtica* spp.: Ordinary plants with extraordinary properties. *Molecules*, 23(7), 1664.
- Kumar, A., & U. Bora. (2014). Molecular docking studies of curcumin natural derivatives with DNA topoisomerase I and II-DNA complexes. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 6(4), 285-291.
- Luna-Vital, D., M. Weiss, & E. Gonzalez de Mejia. (2017). Anthocyanins from purple corn ameliorated tumor necrosis factor- α -induced inflammation and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes via activation of insulin signaling and enhanced GLUT4 translocation. *Molecular nutrition & food research*, 61(12), 1700362.
- Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, & F. Balkwill. (2008). Cancer-related inflammation. *nature*, 454(7203), 436-444.
- Marseglia, L., S. Manti, G. D'Angelo, A. Nicotera, E. Parisi, G. Di Rosa, E. Gitto, & T. Arrigo. (2015). Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. *International journal of molecular sciences*, 16(1), 378-400.
- Martinez-Villaluenga, C., S.G. Rupasinghe, M.A. Schuler, & E. Gonzalez de Mejia. (2010). Peptides from purified soybean β -conglycinin inhibit fatty acid synthase by interaction with the thioesterase catalytic domain. *The FEBS journal*, 277(6), 1481-1493.

- Masaki, T., S. Chiba, H. Tatsukawa, T. Yasuda, H. Noguchi, M. Seike, & H. Yoshimatsu. (2004). Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF- α in KK-Ay obese mice. *Hepatology*, 40(1), 177-184.
- Mauro, L., G.D. Naimo, E. Ricchio, M.L. Panno, & S. Andò. (2015). Cross-talk between adiponectin and IGF-IR in breast cancer. *Frontiers in oncology*, 5, 157.
- Mohammadi, A., B. Mansoori, P.C. Baradaran, V. Khaze, M. Aghapour, M. Farhadi, & B. Baradaran. (2017). Urtica dioica extract inhibits proliferation and induces apoptosis and related gene expression of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Clinical breast cancer*, 17(6), 463-470.
- Moreira, S.A., S. Silva, E.M. Costa, J.A. Saraiva, & M. Pintado. (2020). Effect of high hydrostatic pressure extraction on biological activities of stinging nettle extracts. *Food & function*, 11(1), 921-931.
- Morris, G.M., D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, W.E. Hart, R.K. Belew, & A.J. Olson. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry*, 19(14), 1639-1662.
- Muthusamy, K., P. Kirubakaran, K.D. Singh, S. Nagamani, & S. Sindhu. (2011). Molecular Docking studies of Bitter melon compounds against BRCA1 protein. *Journal of Pharmacy Research*, 4(2), 388-390.
- Obanda, D.N., P. Zhao, A.J. Richard, D. Ribnicky, W.T. Cefalu, & J.M. Stephens. (2016). Stinging nettle (*Urtica dioica* L.) attenuates FFA induced ceramide accumulation in 3T3-L1 adipocytes in an adiponectin dependent manner. *PloS one*, 11(3), e0150252.
- Orčić, D., M. Francišковиć, K. Bekvalac, E. Svirčev, I. Beara, M. Lesjak, & N. Mimica-Dukić. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food chemistry*, 143, 48-53.
- Park, J., T.S. Morley, M. Kim, D.J. Clegg, & P.E. Scherer. (2014). Obesity and cancer—mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(8), 455.
- Piccinini, A.M., K. Knebl, A. Rek, G. Wildner, M. Diedrichs-Möhring, & A.J. Kungl. (2010). Rationally evolving MCP-1/CCL2 into a decoy protein with potent anti-inflammatory activity in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 285(12), 8782-8792.
- Pinelli, P., F. Ieri, P. Vignolini, L. Bacci, S. Baronti, & A. Romani. (2008). Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica* L. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(19), 9127-9132.

- Prabhavathi, H., K. Dasegowda, K. Renukananda, K. Lingaraju, & H.R. Naika. (2021). Exploration and evaluation of bioactive phytochemicals against BRCA proteins by in silico approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(15), 5471-5485.
- Prieto-Martínez, F.D., M. Arciniega, & J.L. Medina-Franco. (2018). Molecular docking: current advances and challenges. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 21.
- Quintero-Fabián, S., D. Ortuño-Sahagún, M. Vázquez-Carrera, & R.I. López-Roa. (2013). Alliin, a garlic (*Allium sativum*) compound, prevents LPS-induced inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *Mediators of inflammation*, 2013.
- Rabia, T., Y. Erden, & S. Tekin. (2019). Bazı önemli tıbbi bitkilerin antioksidan ve antikanser etkilerinin araştırılması. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(2), 435-442.
- Renehan, A.G., M. Zwahlen, & M. Egger. (2015). Adiposity and cancer risk: new mechanistic insights from epidemiology. *Nature Reviews Cancer*, 15(8), 484-498.
- Repajić, M., E. Cegledi, Z. Zorić, S. Pedisić, I. Elez Garofulić, S. Radman, I. Palčić, & V. Dragović-Uzelac. (2021). Bioactive Compounds in Wild Nettle (*Urtica dioica* L.) Leaves and Stalks: Polyphenols and Pigments upon Seasonal and Habitat Variations. *Foods*, 10(1), 190.
- Roberts, C.K., R.J. Barnard, K.H. Liang, & N.D. Vaziri. (2002). Effect of diet on adipose tissue and skeletal muscle VLDL receptor and LPL: implications for obesity and hyperlipidemia. *Atherosclerosis*, 161(1), 133-141.
- Saltiel, A.R., & J.M. Olefsky. (2017). Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*, 127(1), 1-4.
- Sartipy, P., & D.J. Loskutoff. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7265-7270.
- Schleinitz, D., N. Klöting, A. Körner, J. Berndt, M. Reichenbacher, A. Tönjes, K. Ruschke, Y. Böttcher, K. Dietrich, & B. Enigk. (2010). Effect of genetic variation in the human fatty acid synthase gene (FASN) on obesity and fat depot-specific mRNA expression. *Obesity*, 18(6), 1218-1225.
- Semenkovich, C.F. (1997). Regulation of fatty acid synthase (FAS). *Progress in lipid research*, 36(1), 43-53.
- Sindhu, S., R. Thomas, P. Shihab, D. Sriraman, K. Behbehani, & R. Ahmad. (2015). Obesity is a positive modulator of IL-6R and IL-6 expression in the subcutaneous adipose tissue: significance for metabolic inflammation. *PloS one*, 10(7), e0133494.

- Smith, S.J., S. Cases, D.R. Jensen, H.C. Chen, E. Sande, B. Tow, D.A. Sanan, J. Raber, R.H. Eckel, & R.V. Farese. (2000). Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nature genetics*, 25(1), 87-90.
- Society, A.C. (2014). *Cancer facts & figures 2014*: American Cancer Society.
- Şahin, G., & H. Yardımcı. (2016). Obezitenin Meme Kanseri ile İlişkisi. *International Peer-Reviewed Journal of Nutrition Research*(8).
- Şimşir, I.Y., U.E. Soyaltın, & C. Yılmaz. (2018). Obesity and Breast Cancer: Adipose Tissue, Adipocytokines, Chronic Inflammation, and Hypoxia. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 22(4), 244.
- Tanaka, T., M. Narazaki, & T. Kishimoto. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016295.
- Trott, O., & A.J. Olson. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455-461.
- Tello, S., Halifeoğlu, İ., Bozkurt, M., & Bulmuş, Ö. (2008). Meme Kanseri Oluşturulmuş Ratlarda Isırgan Otunun Total Antioksidan Durumu Üzerine Etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, 22, 179-83.
- Wang, H., & R.H. Eckel. (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(2), E271-E288.
- Yalçın, B. (2011), *Isırgan otundaki (Urtica dioica) bazı fenolik bileşiklerin incelenmesi*, M.Sc. Tez, Ege Üniversitesi, İzmir,130s.
- Yen, C.-L.E., S.J. Stone, S. Koliwad, C. Harris, & R.V. Farese. (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *Journal of lipid research*, 49(11), 2283-2301.
- Yıldırım, N. (2018). obezite ve kanser. *Fırat Tıp Dergisi*, 23(obezite ve kanser), 61-67.
- Yu, J., P.-J. Liao, W. Xu, J.R. Jones, D.B. Everman, H. Flanagan-Steet, T.H. Keller, & D.M. Virshup. (2021). Structural model of PORCN illuminates disease-associated variants and drug binding sites. *bioRxiv*.

Dallakyan, S. (2013). AutoDock.
[\[Erişim Tarihi: 24.01.2021, http://autodock.scripps.edu/\].](http://autodock.scripps.edu/)

Web-1:
[https://www.saglik.gov.tr/TR,11692/obezite.html%20\(Eri%C5%9Fim%2001.07.2019](https://www.saglik.gov.tr/TR,11692/obezite.html%20(Eri%C5%9Fim%2001.07.2019)

Web-2:
[BİY 259 11. hafta thoma lamı ve petroff hauser lamı ile sayım \(2\).ppt](#)

Web-3:
https://en.wikipedia.org/wiki/Oil_Red_O

Web-4:
https://hsgm.saglik.gov.tr/Depo/Birimler/Kanser-Db/Yayinlar/Kitaplar/Turkiye_Kanser_Kontrol_Programi_2016.Pdf

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad :A**a E**N
Uyruk :T.C.
Doğum Tarihi :1*/1*/1**4
Doğum Yeri :M****
Medeni Hali :B****
Telefon :0 5*8 2*0 3**0
E-posta :a*****@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	İnönü Üniversitesi	2019

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/Görev
2018	Malatya Turgut Özal Tıp Fakültesi	Stajyer
2019-2020	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü	Kısmi Zamanlı Öğrenci
2021-2022	Tübitak 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans	Araştırmacı
2021-2022	BAP (21/129/03/1/4 nolu proje)	Araştırmacı

Yabancı dil	Başlangıç	Orta	İleri
Okuma			+
Konuşma			+
Yazma			+

Katıldığı Eğitimler ve Bilimsel Faaliyetler

- Malatya Pharmacology Lab. Experimental Animals Certificate-Faculty of Medicine-Malatya (02.05.2017)
- Wie Lnad Event- İzmir Kâtip Çelebi University (08.03.2021)
- İnönü University Poster Presentation- Sub-Units Of Actin Myosin Cells (21.05.2018)
- Muğla Sıtkı Koçman University XI. Science E-Research Symposium Participant (19.11.2019)
- Near East University dean of Students Office Genetics Student Association (10-11.04.2021)
- MBG Turkey Alumni Meeting Conference (03.10.2021)
- BİOKULTUR Conference Artificial Intelligence and Genetics, Ancient DNA, Molecular Biochemistry (03.03.2021)
- BIOINFORCONFERENCE- Conference on Bioinformatics and Interdisciplinary Approaches (20.22.04.2021)
- Muğla Sıtkı Koçman University XII. Science E-Research Symposium Presentation- " Transcriptional analysis of the effects of extracts from some medicinal plants on some obesity and breast cancer markers in 3T3-L1 mouse cell lines (26.05.2021)
- 3rd International Eurasian Conference on Science, Engineering and Technology (EurasianSciEnTech 2021) 15-17 December 2021

Hobiler

Spor yapmak, kitap okumak, seyahat etmek, dans etmek