

**T.C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**METFORMİNİN LİPİD METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN 3T3-L1
HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hatice DURAL
1900002986**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN

HAZİRAN, 2025

T. C.
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**METFORMİNİN LİPİD METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN 3T3-L1
HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice DURAL
1900002986

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik
Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN
Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Öykü GÖNÜL GEYİK (İstinye Ü.)

HAZİRAN, 2025

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamda bilgi ve deneyimleriyle bana her zaman yol gösterici olan, birlikte çalışmaktan memnuniyet duyduğum danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Hem ders döneminde hem de laboratuvar çalışmalarında her konuda yardımcı olan ve yanımda olan canım arkadaşlarım Nasma Elabaddy ve Gunel Mammadova'ya çok teşekkür ederim.

Söylediğim hiçbir terimi anlamasalar dahi sürekli dinleyip anlamaya çalışan, motivasyonum düştüğünde yanımda olan canım arkadaşlarım İrem Betül Demir ve Aysu Ayhan'a hayatımdaki ve derslerimdeki tüm süreçlere destek verdikleri için çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında her konuda bana destek olan, fedakarlık gösteren canım annem Vesile DURAL'a, benim daha güçlü olmamı sağlayan ve gözümde asla büyümeyen sevgili kardeşim Ege DURAL'a teşekkürü borç bilirim.

Fiziken yanımda olmasa da beni izlediğini ve bana destek verdiğini her daim hissettiğim, benimle gurur duyduğuna inanmak istediğim, en büyük destekçim canım babam Okan DURAL'a sonsuz teşekkür ederim. Bu tezi zamanında verdiği tüm emekler için canım babama ithaf ediyorum.

Tanıdığım günden beri benden desteğini esirgemeyen, her anımda yanımda olan, hep elini omzumda hissettiğim, her konuda motivasyon sağlayan, her zaman gülümseten, asla yalnız bırakmayan canım Recep CAN'a yaptığı her şey için teşekkür ederim.

Son olarak 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı ile akademik yaşamıma destek sağlayan TÜBİTAK kurumuna sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Haziran 2025

Hatice DURAL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
KISALTMALAR.....	v
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TÜRKÇE ÖZET	ix
YABANCI DİL ÖZET	xi
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
1.1 Giriş.....	1
1.2 Amaç.....	2
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Obezite.....	3
2.1.1 Obezitenin Belirlenmesi ve Derecelendirilmesi	3
2.1.2 Obezitenin Etiyolojisi	4
2.1.3 Obezitenin Sebep Olduğu Sağlık Problemleri.....	6
2.1.4 Obezitenin Dünyadaki Durumu	9
2.1.5 Obezitenin Türkiye'deki Durumu	10
2.2 Metformin	12
2.2.1 Metformin Kimyasal Yapısı.....	13
2.2.2 Metforminin Etki Mekanizması	14
2.2.3 Obezite Çalışmalarında Metforminin Kullanımı	19
2.3 Lipid Metabolizması	20
2.3.1 Lipidlerin Görevleri ve Sınıflandırılması	20
2.3.2 Lipid Metabolizmasının Ana Yolları	21
2.3.3 Adipoz Doku	24
2.3.4 Adipogenez	25
2.4 Farklılaştırmanın Moleküler Mekanizması	29
3 MATERYAL METOD.....	32
3.1 Kullanılan Materyaller	32
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	32

3.1.2	Hücre Kültürü Donanımları	32
3.1.3	Kullanılan Kimyasallar.....	32
3.1.4	Kullanılan Tamponlar	32
3.2	Yöntemler.....	32
3.2.1	Hücre Kültürü	32
3.2.2	Hücrelerin Çözülmesi.....	32
3.2.3	Hücrelerin Dondurulması.....	33
3.2.4	Hücrelerin Alt Kültüre Alınması (Pasajlanması)	33
3.2.5	Hücrelerin Farklılaştırılması	34
3.2.6	Oil Red O Boyama	34
3.2.7	BODIPY Boyama	34
3.2.8	İmmünofloresan Boyama.....	35
3.2.9	MTT Hücre Canlılığı Testi	35
3.2.10	Memeli Hücrelerinden Protein İzolasyonu.....	36
3.2.11	Bradford Protein Miktar Tayini.....	36
3.2.12	İmmünoblotlama	37
3.2.13	Memeli Hücrelerinden RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	38
3.2.14	Gradient Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	39
3.2.15	Kantitatif-Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	40
3.2.16	İstatiksel Analiz.....	40
4	SONUÇLAR	41
4.1	3T3-L1 Pre-Adipositlerinin Adipositlere Farklılaştırılması	41
4.2	Metformin Uygulanmasının 3T3-L1 Hücrelerinde Hücre Canlılığına Etkisinin İncelenmesi.....	44
4.3	Sentezlenen cDNA Örneklerinin Spektral ve Elektroforetik Yöntemlerle Analiz Edilmesi	45
4.4	Gradient PCR İle Primerlerin Optimum Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi	46

4.5 3T3-L1 Hücrelerinde Metformin Uygulamasının Lipid Metabolizmasına Ait Protein Ekspresyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	49
4.6 3T3-L1 Hücrelerinde Metformin Uygulamasının Lipit Metabolizmasına Ait Genlerin Ekspresyonları Üzerine Etkisinin qRT-PCR ile Gösterilmesi	50
5 TARTIŞMA.....	54
KAYNAKÇA.....	60
EKLER.....	72
Ek A: Çalışmada Kullanılan Cihazların Listesi	72
Ek B: Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Donanımları	73
Ek C: Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Listesi	74
Ek D: Çalışmada Kullanılan Tamponların İçeriği	75

KISALTMALAR

Ca⁺² : Kalsiyum (+2) yüklü iyonu
cAMP : Siklik Adenozin Mono Fosfat
mRNA : Mesajcı Ribonükleik Asit
DNA : Deoksiribonükleik Asit
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CREB : cAMP Cevap Elementi Bağlanma Proteini
Tyr : Tirozin
AMPK : AMP ile Aktive olan Kinaz
mTOR : Rapamisinin Memeli Hedefi
FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
kDa : Kilodalton
dk : Dakika
BSA : Bovine Serum Albumin
SDS : Sodyum dodesil sülfat
PAGE : Poliakrilamid Jel Elektroföresi
PVDF : Poliviniliden florid
TBS-T : Tris-tamponlu tuz-Tween 20
HRP : Yabani turp peroksidazı
PBS : Fosfat-tamponlu tuz
FBS : Fetal Sığır Serumu
qRT-PCR : kantitatif-Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
sn : Saniye
bp : Baz çifti
EDTA : Etilendiamin tetra asetik asit
ATCC : Amerikan-tipi kültür koleksiyonu
CO² : Karbondioksit
MTT : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür
DMSO : Dimetil sülfoksit
IF : İmmunofloresan
H₂O₂ : Hidrojen peroksit
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
BKİ: Beden Kitle İndeksi
Tümör nekroz faktörü- α : TNF- α
İnterlökin-6: IL-6

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

α : Alfa
 β : Beta
 γ : Gamma
°C : Santigrat derece
L : Litre
ml : Mililitre
g : Yerçekimsel kuvvet
mg : Miligram
 μ : Mikro
 μ l : Mikrolitre
 μ g : Mikrogram
nm : Nanometre
% : Yüzde
mm : Milimetre
V : Volt
A : Amper
M : Molar
nM : Nanomolar
 μ M : Mikromolar
mM : Milimolar
 μ m : Mikrometre

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Yetişkinlerde BKİ'ne göre zayıflık, fazla kiloluluk ve obezitenin sınıflandırılması (Obezite, n.d.).....	3
Tablo 2.2: Adipogenez Basamakları (Lefterova & Lazar, 2009).....	26
Tablo 3.1: qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler	39
Tablo 4.1: cDNA Örneklerinin Spektrofotometre Sonuçları	46
Tablo A.1: Kullanılan Cihazların Listesi	72
Tablo B.1: Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Donanımları Listesi.....	73
Tablo C.1: Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Listesi	74
Tablo D.1: Çalışmada Kullanılan Tamponların İçeriği	75
Tablo D.2: %4'lük ve %12'lik SDS- Poliakrilamid Jellerinin İçeriği	77
Tablo D.3: Kemilüminesans Görüntüleme Tampon İçerikleri.....	77
Tablo D.4: Gradient PCR Örneklerinin Hazırlanması.....	77
Tablo D.5: Gradient PCR 'da Kullanılan Protokol	78
Tablo D.6: qRT-PCR 'da Kullanılan Protokol.....	78

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2-1: Dünya'da Yetişkinlerde Obezite Yaygınlığı (BKİ ≥ 30 kg/m ²) (TÜİK Kurumsal, n.d.)	10
Şekil 2-2: Türkiye'de Yıllara Göre Kadın ve Erkeklerde BKİ Dağılımı (2008-2022) (TÜİK Kurumsal, n.d.).....	11
Şekil 2-3:Metforminin yapısal formülü ve üç boyutlu yapısı (Q. Chen et al., 2017).....	14
Şekil 2-4:Metforminin mitokondriyal etkisinin gösterilmesi. (Apostolova et al., 2020)	15
Şekil 2-5: AMPK'nın hücrel regülasyonu (KİSMİROĞLU et al., 2020)	17
Şekil 2-6: De Novo Lipogenez Basamakları (Che et al., 2019).	22
Şekil 2-7: Adipositlerde Lipoliz Süreci (Ahmadian et al., 2010)..	23
Şekil 2-8: Mitokondrilerde serbest yağ asitlerinin β -oksidasyonu. (Begrliche et al., 2011)	24
Şekil 2-9: Beyaz Adipoz Doku ve Kahverengi Adipoz Dokunun Gösterilmesi (Frankl et al., 2019).	25
Şekil 2-10:Adipogenezde PPAR γ 'nın düzenlenmesi (H. Y. Kim et al., 2024)	27
Şekil 2-11:Adipogenezde C/EBP'lerin düzenlenmesi (H. Y. Kim et al., 2024)	28
Şekil 2-12:SREBP'ler ve PPAR γ arasındaki etkileşim (H. Y. Kim et al., 2024)	28
Şekil 2-13: Pre-adipositlerin Adipositlere Farklılaştırılmasının Şematik Olarak Gösterilmesi (Kazemi et al., 2025).	31
Şekil 4-1: 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma süreci boyunca ışık mikroskobu görüntüleri.	41
Şekil 4-2: 3T3-L1 hücrelerinin Oil Red O boyama görüntüleri.....	42
Şekil 4-3: 3T3-L1 hücrelerinin BODIPY boyama görüntüleri	43
Şekil 4-4: 3T3-L1 hücrelerinin immünofloresan boyama görüntüleri.....	44
Şekil 4-5:Metforminin MTT yöntemi ile 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi.	45
Şekil 4-6: RNA Örneklerinin Elektroforetik Sonuçları.	46
Şekil 4-7: β -actin Primerinin Gradient PCR Görüntüsü.	47
Şekil 4-8: FASN Primerinin Gradient PCR Görüntüsü.	47
Şekil 4-9: SREBP-1c Primerinin Gradient PCR Görüntüsü.	48
Şekil 4-10:PPAR- γ Primerinin Gradient PCR Görüntüsü.	48
Şekil 4-11:CEBP- α Primerinin Gradient PCR Görüntüsü.	48
Şekil 4-12: 3T3-L1 Hücrelerinde Metforminin Lipid Metabolizmasına Etkisinin İmmünoBlotlama Yöntemi İle İncelenmesi.....	50
Şekil 4-13: 3T3-L1 Hücrelerinde Metforminin Lipid Metabolizmasına Etkisinin qRT-PCR Yöntemi İle İncelenmesi.....	51
Şekil 4-14: 3T3-L1 Hücrelerinde Farklılaştırma ve Metformin Uygulamasının İnsülin Direncine Etkisinin qRT-PCR Yöntemi İle İncelenmesi.....	51

TÜRKÇE ÖZET

Enstitüsü : Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Burcu AYHAN ŞAHİN
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Haziran 2025

KISA ÖZET

METFORMİNİN LİPİD METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN 3T3-L1 HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

Hatice DURAL

Obezite, günümüzde giderek artan bir prevalansa sahip bir halk sağlık sorunu olarak pek çok kronik hastalığın temelini oluşturmaktadır. Metformin ise özellikle tip 2 diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan anti-diyabetik bir ilaçtır. Metformin son yıllarda, obezite ve lipid metabolizması üzerindeki etkileri oldukça dikkat çekmektedir. Metforminin obezite ve lipid metabolizmasında etkilerinin moleküler düzeyde anlaşılabilmesi için in vitro obezite çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir model olan 3T3-L1 pre-adiposit hücre hattı kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında farklılaştırılmış 3T3-L1 adiposit hücrelerine metformin uygulamasıyla lipid metabolizmasında görev alan bazı temel proteinlerin ekspresyon seviyelerine etkisi araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda üç farklı deney grubu oluşturulmuştur: Kontrol grubu, farklılaştırılmış hücre grubu ve farklılaştırılmış hücrelere metformin uygulanmış grup.

Pre-adiposit 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmaya indüklenmesi için pre-diferansiyasyon ortamı (IBMX, DEX, İnsülin) ve diferansiyasyon ortamı (İnsülin) kullanılmıştır. Metformin uygulaması farklılaştırma sürecinde gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerden izole edilen proteinler Western Blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Lipid metabolizmasında rol oynayan PPAR γ , SREBP1c, FASN ve ACC proteinlerin ekspresyonları GAPDH referans proteini kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen

bulgular farklılaştırma grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında mevcut proteinlerin ekspresyon düzeylerinde beklenenin aksine bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak metformin uygulanan grupta farklılaştırma grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu durum metforminin farklılaşma sırasında oluşan baskılanmayı tersine çevirerek adiposit hücrelerinin fonksiyonları üzerinde düzenleyici bir etki yarattığını göstermektedir. Protein ekspresyonlarındaki değişiklikleri desteklemek amacıyla qRT-PCR yöntemi gerçekleştirilerek genlerin mRNA ekspresyonları analiz edilmiştir. Gen ekspresyon analizleri, protein ekspresyonlarındaki değişikliklerle uyumludur. Farklılaşma grubunda kontrol grubuna kıyasla gen ekspresyonlarında azalma, metformin uygulamasıyla tekrardan bir artma gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında metforminin yalnızca glukoz metabolizmasına değil, adiposit hücrelerinin farklılaşması ve lipid metabolizması üzerindeki düzenleyici bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Bu tez çalışması kapsamında metforminin adiposit hücrelerinin fonksiyonları ve lipid metabolizması üzerindeki etkileri ilk kez bu özgül protein ve mRNA paneli üzerinden değerlendirilerek metforminin potansiyel lipid metabolizmasındaki regülatör özelliklerine ışık tutmuştur.

Anahtar Sözcükler: Obezite, Metformin, Adiposit, 3T3-L1, Lipid Metabolizması

Bilim Dalı Sayısal Kodu: 20610

YABANCI DİL ÖZET

Institute : Institute of Graduate Studies
Department : Molecular Biology and Genetics
Programme : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Asst. Prof. Burcu AYHAN ŞAHİN
Degree Awarded and Date : MA – June 2025

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF METFORMIN ON LIPID METABOLISM IN 3T3-L1 CELLS

Hatice DURAL

Obesity is an increasingly prevalent public health issue today and forms the basis of many chronic diseases. Metformin is a widely used anti-diabetic drug, especially in the treatment of type 2 diabetes. In recent years, the effects of metformin on obesity and lipid metabolism have attracted considerable attention. To understand the effects of metformin on obesity and lipid metabolism at the molecular level, the 3T3-L1 pre-adipocyte cell line—a commonly preferred model in in vitro obesity studies—was used.

In this thesis study, it was aimed to investigate the effects of metformin application on the expression levels of certain key proteins involved in lipid metabolism in differentiated 3T3-L1 adipocyte cells. In this context, three different experimental groups were established: control group, differentiated cell group, and metformin-treated differentiated cell group.

For the induction of differentiation in pre-adipocyte 3T3-L1 cells, a pre-differentiation medium (IBMX, DEX, insulin) and a differentiation medium (insulin) were used. Metformin was applied during the differentiation process.

Proteins isolated from the cells were analyzed using the Western Blot method. The expressions of PPAR γ , SREBP1c, FASN, and ACC—proteins involved in lipid metabolism—were evaluated using GAPDH as a reference protein. The results showed a decrease in the expression levels of these proteins in the differentiation group compared to the control group, contrary to expectations. However, a significant increase was observed in the metformin-treated group compared to the differentiation group. This

suggests that metformin reverses the suppression occurring during differentiation and exerts a regulatory effect on adipocyte cell functions. To support the changes in protein expressions, gene expression analyses were performed using the qRT-PCR method. Gene expression analyses were consistent with the changes in protein expression. While there was a decrease in gene expressions in the differentiation group compared to the control, an increase was observed again with metformin treatment.

In conclusion, this thesis study demonstrates that metformin has a regulatory effect not only on glucose metabolism but also on adipocyte cell differentiation and lipid metabolism. Within the scope of this study, the effects of metformin on adipocyte functions and lipid metabolism were evaluated for the first time using this specific protein and mRNA panel, shedding light on the potential regulatory role of metformin in lipid metabolism.



Key Words: Obesity, Metformin, Adipocyte, 3T3-L1, Lipid Metabolism

Science Code: 20610

1 GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Giriş

Obezite, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde prevalansı hızla artmakta olan metabolik bir bozukluktur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünya çapında bir milyardan fazla insan obezdir ve bu değer gittikçe artmaktadır. Obezitenin temelini, enerji alımı ve enerji harcanmasının dengesizliğinden kaynaklı artan adipoz doku miktarı oluşturmaktadır. Obezite, enerji metabolizması bozukluğunun yanı sıra hücreyel düzeyde karmaşık bir dizi biyokimyasal ve moleküler mekanizmaların bir sonucudur.

Adipogenez süreci pre-adiposit hücrelerin olgun adipositlere farklılaşmasını sağlayan çok basamaklı karmaşık bir süreçtir. Bu süreç, bir dizi transkripsiyon faktörü aracılığıyla gerçekleşmektedir. Özellikle peroksizom proliferatör aktiveli reseptör gamma (PPAR γ), CCAAT/ güçlendirici bağlayıcı protein α (C/EBP α), sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1c (SREBP1c) ve yağ asit sentaz (FASN) gibi metabolik proteinler farklılaşma sürecinde önemli rol oynamaktadırlar.

Adipogenez sürecinin *in vitro* modellerde incelenmesi için 3T3-L1 pre-adiposit hücre hattı adipositlere farklılaşmada sıklıkla tercih edilmektedir. Bu hücre hattı uygun farklılaşma koşullarında adipositlere farklılaştırılmakta ve adipogenez sürecinin moleküler düzeyde anlaşılmasına olanak sağlamaktadır.

Tip 2 diyabet tedavisinde birincil basamak tedavi olarak kullanılan metformin, biguanid sınıfına ait oral, anti-hiperglisemik farmakolojik bir ajandır. Genel etki mekanizması, hepatik glukoneogenezin baskılanması ve periferik insülin duyarlılığının artmasıdır. Metformin bu etkilerini 5'- adenosin monofosfat (AMP) ile aktive olan protein kinaz (AMPK) bağımlı ve bağımsız yollar aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Ancak son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, metforminin anti-adipojenik etkilerinin dikkat çekici olduğu yönündedir. Metforminin insülin sinyal yolları, inflamasyon, mitokondriyal fonksiyon ve hücreyel enerji metabolizması üzerinde çeşitli etkileri bulunmaktadır. Ancak metforminin

lipit metabolizması üzerindeki etkilerine ilişkin bulgularda bazı çelişkiler yer almaktadır. Bazı çalışmalar metforminin adiposit farklılaşmasını inhibe ettiğini öne sürerken, diğer çalışmalar bu etkinin hücre tipine, uygulama dozuna, süresine ve farklılaşma evresine bağlı olarak değişiklik gösterebileceğini göstermektedir. Metforminin lipid metabolizması üzerindeki etkilerinin altında yatan karmaşık mekanizmayı anlayabilmek ve bu çelişkileri ortadan kaldırmak adına daha fazla araştırmaya gerek duyulmaktadır.

1.2 Amaç

Sonuç olarak bu çalışmada, 3T3-L1 pre-adipositlerin farklılaşma süresince uygulanan metforminin adipogenez süreci ve lipid metabolizması üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmaktadır. Elde edilen veriler ışığında bu çalışmanın, metforminin adiposit farklılaşması ve lipit metabolizmasındaki düzenleyici potansiyel etkilerinin ortaya konulması ve literatürdeki karışıklıkları aydınlatması amaçlanmaktadır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Obezite

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) obeziteyi, sağlık açısından risk oluşturan anormal ve aşırı yağ birikimi olarak tanımlamaktadır (Blüher, 2020). Obezite, aşırı yağ depolanmasıyla ortaya çıkan ruhsal ve fiziksel sorunlara da sebebiyet veren bir enerji metabolizması bozukluğudur. Vücutta harcanamayan enerjinin yağ olarak depolanması pek çok sağlık probleminin oluşmasına zemin oluşturmaktadır. Bu durum kişilerin yaşam süresini ve kalitesini olumsuz etkilemektedir (Şimsir et al., 2018).

2.1.1 Obezitenin Belirlenmesi ve Derecelendirilmesi

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre bir bireyin obez olarak tanımlanmasında beden kitle indeksi (BKİ) kullanılmaktadır. BKİ, bireyin vücut ağırlığının (kg), bireyin boyunun (m) karesine bölünmesiyle hesaplanmaktadır ($BKİ=kg/m^2$) (WHO, 2015). DSÖ'ye göre uluslararası obezite sınıflandırılması Tablo 2.1: Yetişkinlerde BKİ'ne göre zayıflık, fazla kiloluluk ve obezitenin sınıflandırılması (Obezite, n.d.) 'de verilmiştir.

Tablo 2.1: Yetişkinlerde BKİ'ne göre zayıflık, fazla kiloluluk ve obezitenin sınıflandırılması (Obezite, n.d.)

Sınıflandırma	BKİ (kg/m ²)	
	Temel kesişim noktaları	Geliştirilmiş kesişim noktaları
Zayıf (düşük ağırlıklı)	<18.50	<18.50
Aşırı düzeyde zayıflık	<16.00	<16.00
Orta düzeyde zayıflık	16.00 - 16.99	16.00 - 16.99
Hafif düzeyde zayıflık	17.00 - 18.49	17.00 - 18.49
Normal	18.50 - 24.99	18.50 - 22.99
		23.00 - 24.99
Toplu, hafif şişman, fazla kilolu	>25.00	>25.00
Şişmanlık öncesi (Pre-obez)	25.00 - 29.99	25.00 - 27.49

		27.50 - 29.99
Şişman (Obez)	>30.00	>30.00
Şişman I. Derece	30.00 - 34.99	30.00 - 32.49
		32.50 - 34.99
Şişman II. Derece	35.00 - 39.99	35.00 - 37.49
		37.50 - 39.99
Şişman III. Derece	> 40.00	> 40.00

Obezite için vücutta aşırı yağ birikimi kadar, bu yağın vücutta bulunduğu bölge ve dağılımı da son derece önemlidir. Vücuttaki yağın bulunduğu bölge ve yağın dağılımı, hastalıkların morbidite ve mortalitesi ile de son derece ilişkilidir. Bölgesel yağlanmanın dağılımı erkek ve kadın bireylerde genetik olarak fark göstermektedir. Obezitede yağ vücudun üst bölgesinde (elma tipi), bel, üst karın, göğüs bölgesinde ve cilt altında toplandığı şekle Android tipi (erkek tipi) denilmektedir. Obezitede yağ vücudun alt bölgesinde (armut tipi), kalça, uyluk, bacaklar ve cilt altında toplandığı şekle ise Jinoid tipi (kadın tipi) denilmektedir (*Obezite*, n.d.).

Karın (abdominal) yağlanma miktarının belirlenmesi için bel çevresi/kalça çevresi oranı sıklıkla kullanılan basit yöntemler arasındadır. Yağın abdominal bölge ve iç organ etrafında toplanmasıyla insülin direnci, tip 2 diyabet, hipertansiyon, dislipidemi, koroner arter hastalıklarına yakalanma riski yakından ilişkilidir. Ayrıca bel çevresi ölçümünün erkeklerde 94 cm, kadınlarda ise 80 cm ve üzerinde olması da hastalıklarla yakından ilişkilidir (Demiray, Yorulmaz, 2023). Bu nedenle, obezitenin değerlendirmesinde yalnızca beden kitle indeksi gibi genel sınıflandırmalar yeterli olmayıp, bireyin vücudundaki yağ dağılımı da dikkate alınmalıdır. Yağ dağılımı analizleri ile bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımları geliştirmek ve obeziteye bağlı gelişen komplikasyonların önlenmesinde kritik bir role sahiptir (Ozrail et al., 2022).

2.1.2 Obezitenin Etiyolojisi

Obezite genel anlamıyla enerji metabolizmasının dengesizliğinden kaynaklanan multifaktöriyel bir hastalık olsa da obezitenin etiyolojisi oldukça karmaşıktır. Obezitenin etiyolojisi, genetik, çevresel, psikolojik ve sosyal faktörlerden oluşmaktadır. Temel faktörler arasında, beslenme alışkanlıkları, yetersiz fiziksel aktivite düzeyi, yaş, cinsiyet,

eğitim düzeyi, sosyoekonomik düzey, kültürel etmenler, genetik yatkınlık, psikolojik etmenler, hormonal ve metabolik bozukluklar, sigara ve alkol kullanımı, kullanılan bazı ilaçlar, ekonomik düzey ve özellikle kadınlarda doğum sayısı ile doğumlar arası süre bulunmaktadır (Riaz et al., 2023).

Dengesiz beslenme ve fiziksel aktivite yetersizliği, obezitenin bilinen en yaygın nedenleri arasında bulunmaktadır. Yüksek kalorili ve besin içeriği düşük gıdaların fazlaca tüketilmesi ve sedanter yaşam şekli, bireylerde enerji alımı ve harcanması arasında dengesizliğe yol açarak kilo artışına neden olmaktadır. Çevresel faktörler kadar genetik faktörlerde obezitenin gelişmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle leptin genindeki genetik varyasyonlar, iştah ve enerji dengesini doğrudan etkilemektedir. İnsülin duyarlılığındaki değişiklikler ve epigenetik modifikasyonlar genetiğin obezite üzerindeki etkileri arasında örnek gösterilebilmektedir (Concepción-Zavaleta et al., 2024). Psikolojik faktörler de obezite gelişimiyle yakından ilgilidir. Stres, anksiyete ve depresyon gibi psikolojik durumlar, duygusal yeme davranışlarını tetikleyerek aşırı kilo alımına neden olabilmektedir. Ayrıca, uyku durumu bozuklukları da hormonal dengeleri etkileyerek iştah artışına ve obeziteye yol açabilmektedir (Riaz et al., 2023). Hormonal ve metabolik bozukluklar da obezite ile yakından ilişkilendirilmektedir. Hipotiroidizm, Cushin sendromu, leptin direnci, insülin direnci, polikistik over sendromu, hiperlipidemi, hiperglisemi, hipertansiyon gibi metabolik bozukluklar enerji dengesini etkileyerek obeziteye zemin hazırlayabilmektedir (Mazza et al., 2024).

Obezite nedenleri arasında bulunan sosyoekonomik faktörler, düşük gelir ve eğitim düzeyine bağlı olarak, bireylerin sağlıklı beslenmeye, sağlık hizmetlerine ve fiziksel aktiviteye erişimde zorluklar yaşamasıyla ilişkilendirilebilmektedir. Sonuç olarak, obezitenin etiyolojisi çok yönlü ve oldukça karmaşıktır. Bu nedenle, obeziteyle mücadelede bireysel ve toplumsal düzeyde kapsamlı stratejiler geliştirilmesi gerekmektedir. Bunlar arasında sağlıklı beslenme alışkanlıklarının teşviki, fiziksel aktivitenin artırılması, psikolojik destek hizmetlerinin sunulması ve sosyoekonomik eşitsizliklerin azaltılması gibi önlemler bulunmaktadır (Adamou et al., 2024).

2.1.3 Obezitenin Sebep Olduğu Sağlık Problemleri

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünya çapındaki ölümlerin %63'ü bulaşıcı olmayan hastalıklar sebebiyle gerçekleşmektedir. Bulaşıcı olmayan hastalık ölümlerinin %48'i kardiyovasküler hastalıklar, %21'i kanserler, %12'si kronik solunum sistemi hastalıklarından, %3,5'u diyabetten kaynaklanmaktadır (WHO, 2021). DSÖ verilerine göre 2022 yılında dünyada 2,5 milyar yetişkin fazla kilolu, 890 milyon yetişkin ise obezdir. Yaklaşık olarak her 8 kişiden 1'i obez olarak hayatına devam etmektedir. 1990 yılından 2022 yılına kadar yetişkinlerde obezite iki kattan fazla artarken, ergenlik çağı obezitesi ise dört katına çıkmıştır. Obezitenin prevalansındaki hızlı artışına bağlı olarak ikincil hastalıkların anlaşılması ve tedavisi halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır (WHO, 2023). Obezite, bireyin yalnızca yaşam kalitesini düşüren bir durumun yanında, pek çok kronik hastalığın etiolojisinde yer alan önemli bir risk faktörüdür. Obez bireylerde, artan adi poz doku miktarına bağlı olarak, proinflatuvar sitokinlerin ve adipokinlerin salınımı artarak insülin direnci, ateroskleroz, karaciğer hastalıkları, bazı kanser türleri ve psikolojik hastalıkların görülme sıklığı da artmaktadır (Schübel et al., 2018).

Obezite, viseral yağ dokusundaki artış sebebiyle kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde rol oynayan multifaktöriyel bir risk etmenidir. Artan adi poz doku, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) ve leptin gibi proinflatuvar sitokinlerin ve adipokinlerin salınımını artırarak inflamasyona neden olmaktadır. Bu durum endotel disfonksiyon, arteriyel sertlik, aterosklerotik plak oluşumu aracılığıyla kardiyovasküler sistemde hasara neden olmaktadır (Powell-Wiley et al., 2021). Ayrıca obez bireylerde sıklıkla görülen dislipidemi, hipertansiyon, insülin direnci gibi metabolik sendrom belirteçleri ateroskleroza bağlı kardiyovasküler hastalıklar riskini de arttırmaktadır (Piché et al., 2020).

Obezite ile karaciğer hastalıkları, karaciğer yağlanması da çok yakından ilişkilidir. Artan adi poz doku karaciğerde lipid birikimiyle birlikte steatoz, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD), metabolik disfonksiyonla ilişkili steatotik karaciğer hastalığı (MASLD), hepatoselüler karsinom (HCC) gibi hastalıklara sebep olmaktadır (Chaney, 2021). Obez bireylerde %70 oranında MASLD görülmektedir. MASLD; insülin direnci,

artmış serbest yağ asidi ve inflamatuvar sitokin salınımına bağlı olarak karaciğer hücrelerinde hasara yol açan bir hastalıktır. Hastalığın ilerleyen durumunda karaciğer nakli gibi ağır tablolar görülebilmektedir. Bu durum obezitenin sadece metabolik bir bozukluk olmasının yanında ciddi bir hepatotoksik durum olarak daha ciddi değerlendirilmesi gerektiğini ortaya çıkartmaktadır (Younossi et al., 2024).

Tip 2 diyabet mellitus (T2DM) risk faktörleri arasında obezite, en sık karşılaşılan faktörlerden biridir. Obezitenin, serbest yağ asitleri, IL-6, TNF- α gibi sitokinlerin salınımını tetiklenmesiyle sistematik insülin direncine sebep olur. Bu durum, karaciğer, kas ve yağ dokusunda insülin sinyal yollarında bir bozukluğa sebep olarak glukozun hücre içine girişine engel olur. Artan glisemik yükü dengelemek için pankreatik hücrelerde fazla insülin salgılanmasıyla hücre fonksiyon kaybı görülür. Bu durum T2DM'nin patogenezini oluşturur (Chandrasekaran & Weiskirchen, 2024). Yapılan çalışmalarda, beden kitle indeksindeki (BKİ) her 5 kg/m²'lik artış T2DM riskini %90'a varan oranlarda bir artışa sebep olduğunu göstermektedir (Lingvay et al., 2022).

Metabolik sendrom (MetS); abdominal obezite, hipertansiyon, insülin direnci, hiperglisemi ve dislipidemi (yüksek trigliserid, düşük yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) düzeyi ile tanımlanan kardiyometabolik bir durumdur. Obez bireylerde MetS görülme riski, normal BKİ değerine sahip bireylere oranla 4-6 kat daha fazladır. Obezite derecesi arttıkça MetS bileşenleri de ona paralel olarak artmaktadır. Obezite MetS'in hem başlamasında hem de ilerlemesinde merkezi bir role sahiptir. Obezitenin kontrol altına alınması metabolik sendroma bağlı gelişen kardiyovasküler ve metabolik komplikasyonların önlenmesinde ciddi bir öneme sahiptir (Belladelli et al., 2022; H.-L. Kim et al., 2022; D. F. Wang et al., 2025).

Artan yağ dokusu ile pulmoner sistem üzerine artan baskı ve sistemik inflamasyonun tetiklediği biyokimyasal değişiklikler nedeniyle solunum sistemi yakından etkilenmektedir. Abdominal obezite, diyaframın hareketini kısıtlayarak akciğerlerin hacminin azalmasına neden olur. Bu durum total akciğer kapasitesinde, fonksiyonel kapasitede ve soluk verme hacminde kısıtlamalar yaparak astım, obstrüktif uyku apnesi sendromu (OUAS) gibi solunumsal hastalıkların görülme riskini arttırmaktadır. Özellikle OUAS ile obezite arasında yakından bir ilişki bulunmaktadır. Üst solunum yollarındaki

yumuşak doku hacminin artması, kas dokusunun azalmasına bağlı tekrarlayan uyku ataklarına, akciğer çökmelerine ve kandaki oksijen seviyelerinin azalmasına sebebiyet vermektedir (Arslan et al., 2024; Ren et al., 2021).

Obezitenin direkt olarak en çok etkilediği sistemler arasında vücut ağırlığının mekanik yüklenmesine bağlı olarak kas ve iskelet sistemi bulunmaktadır. Fazla kilo kalça, bel ve diz bölgesindeki eklemlere aşırı basınca bağlı olarak yapısal ve fonksiyonel hasara neden olabilmektedir. Artan yağ kütlesi ve azalan kas kütlesiyle beraber obez bireylerde hareket yeteneğinin azalması, denge kaybı, postür bozuklukları, sarkopeni ve ortopedik hasarlar sıklıkla görülmektedir. Obez bireylerde kas-iskelet sistemi hasarı, düşme ve kırık riskini arttırmakta, hayat kalitesini ciddi oranda azalmaktadır. Bu durum, obezitenin sadece metabolik etkilerinin yanı sıra hareket sistemini ve bireysel hayatı da yakından etkileyen bir sağlık sorunu olduğunu göstermektedir (R. Chen & Armamento-Villareal, 2024; Donini et al., 2022).

Obezitenin fiziksel ve biyokimyasal etkilerinin yanı sıra bireyde psikolojik ve sosyal açıdan etkileri bulunmaktadır. Bireylerde görülen psikolojik etki genelde beden algısının beğenilmemesinden kaynaklanmaktadır. Obez bireylerde genel popülasyona oranla depresyon, anksiyete ve düşük özsaygı gibi sorunlar daha sık görülmektedir. (Dakanalis et al., 2023). Özellikle kadınlarda toplumsal güzellik kalıplarına uyamama hissi, duygusal yeme davranışlarını tetiklenmektedir. Bu durum da obeziteyle ilişkilendirilerek kısır bir döngü oluşturmaktadır. Obezitenin psikolojiyle çift yönlü etkileri yalnızca fiziksel tedavi süreci yerine psikososyal yönlerle bütüncül yaklaşım gerekmektedir (Bremner et al., 2020).

Obezitenin yakından ilişkili olduğu bir diğer hastalık grubu ise kanserdir. Aşırı kilo veya obezite düzeyleri, kanserin önlenemez nedenleri arasında birçok kanser türünün artan yaygınlığının ana belirleyicilerindedir (Friedenreich et al., 2021). Obezitenin artmasına bağlı olarak bireylerde kanser riski de artmaktadır. Kanser çeşitlerinden özellikle menopoza sonrası meme kanseri, endometriyum kanseri, kolorektal kanser, pankreas kanseri, böbrek kanseri, özofagus adenokarsinomu ve tiroit kanseri obez bireylerde sıklıkla görülmektedir (de Andrade Mesquita et al., 2023). Obezite, yağ hücresinin endokrin fonksiyonu değiştirmektedir. Obezitenin neden olduğu metabolik bozukluklar,

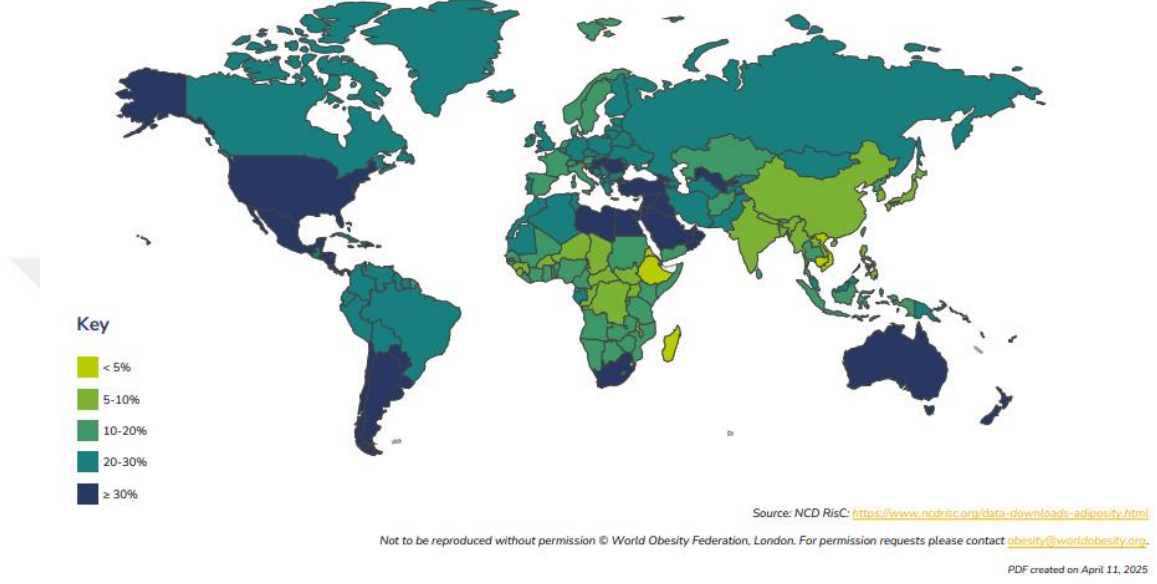
insülin direnci, buna bağlı gelişen hiperinsülinemi, hiperglisemi ve kronik inflamasyon tümör mikroçevresinde ve bağırsak mikrobiyomunda değişikliklere neden olmaktadır. Özellikle obez bireylerde sıklıkla arttığı görülen insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), hücre proliferasyonunu ve tümör gelişimini destekleyen sinyal yollarını aktive etmektedir. Artan adipoz doku, leptin salınımını arttırarak tümör hücresinin büyümesini desteklerken, tümör baskılayıcı göreve sahip adiponektin salınımı baskılamaktadır. Bu durum kanser hücrelerinin büyümesini kolaylaştırmaktadır (Karra et al., 2022).

Sonuç olarak obezite sadece fazla kilo alımıyla sınırlandırılabilir bir hastalık değildir. Vücuttaki sistemleri etkileyerek kardiyovasküler hastalıklar, karaciğer, böbrek hastalıklar, solunum yolu hastalıkları, diyabet ve metabolik sendrom, kas-iskelet hastalıkları, psikolojik rahatsızlıklar ve kanser çeşitleriyle pek çok hastalıkla yakından ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle obezitenin önlenmesi ve toplumda obezite yönetimi yalnızca bireysel sağlığın ötesinde bir durumdur.

2.1.4 Obezitenin Dünyadaki Durumu

Obezite, önceki yıllarda ekonomik düzeyi yüksek olan gelişmiş ülkelerde görülen bir sağlık sorunu iken günümüzde ekonomik düzey fark etmeksizin her ülkede görülebilen bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Özellikle son 50 yıldır obezitenin yaygınlığı dünya çapında hızla artarak pandemi boyutlarına ulaşmıştır (Blüher, 2019). DSÖ verilerine göre obezite tanısı almış birey sayısı yaklaşık olarak 400 milyondur. Obezite oranlarındaki artış çoğunlukla Amerika Birleşik Devletleri'nde görülmekte olup, günümüzde her 3 yetişkin bireyden birinde obezite görülmektedir (Rosenthal et al., 2017). ABD'de yapılan bir incelemede 20 yaşın üzerindeki nüfusun %22,5'inin obez, %54,9'unun aşırı kilolu olduğu gösterilmiştir. İncelemenin yaptığı tahminlere göre 2030 yılında ABD'deki birçok eyalette obezite sıklığının %50 oranına varacağı öngörülmektedir (Borrell & Talih, 2012). Obezite artışı ile ilgili yapılan bir çalışma da OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development -Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü) ülkelerinde son on yılda obezitenin büyük bir oranda arttığı ve OECD ülkelerinin nüfusunun yarısından fazlasının (%52,6) aşırı kilolu ya da obez olduğu belirlenmiştir (Devaux & Sassi, 2013). 16 farklı Avrupa ülkesinde yapılan çalışmada ise obezite yaygınlığının kadınlarda %11,5,

erkeklerde ise %14 olduğu belirlenmiştir. BKİ'si 25'in üstünde olanların oranı ise kadınlarda %40,8 iken erkeklerde %54,5 olarak belirlenmiştir (Gallus et al., 2015).



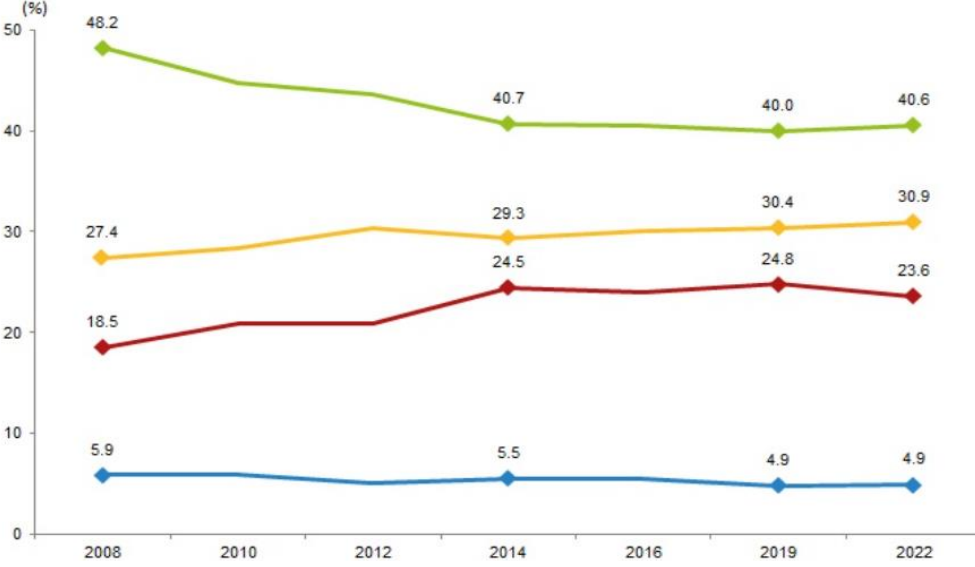
Şekil 2-1: Dünya'da Yetişkinlerde Obezite Yaygınlığı (BKİ ≥ 30 kg/m²) (TÜİK Kurumsal, *n.d.*)

2.1.5 Obezitenin Türkiye'deki Durumu

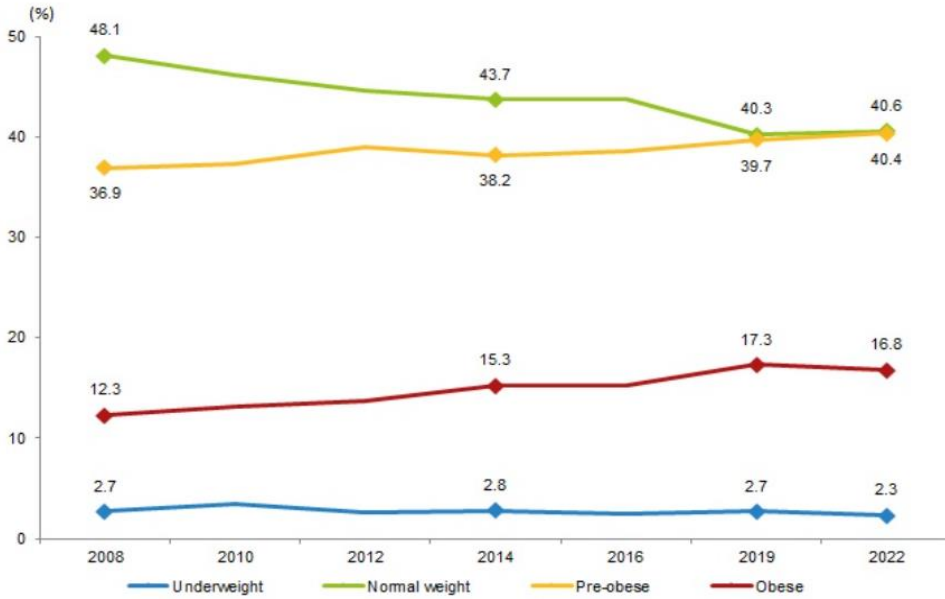
Obezitenin Türkiye'deki durumu incelendiğinde ise durumun diğer ülkelerden çok da farklı olmadığı görülmektedir. Ülkemizde erişkin toplumda obezite sıklığı özellikle kadınlarda %30 oranlarına ulaşmaktadır. 2010 yılında Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması'na göre Türkiye'deki obezite sıklığı kadınlarda %41, erkeklerde %20,5, genel toplumda ise bu oran %30,3 olarak belirlenmiştir (TBSA, 2010). Türkiye'de 12 yıl arayla 540 merkezde, 20 yaş ve üzeri 24.788 yetişkinin dahil edildiği popülasyon temelli yapılan TURDEP-I (Türkiye Diyabet Prevalans) ve TURDEP-II çalışmalarına göre 1998 yılında obezite prevalansı %22,3 (kadınlarda %32,9, erkeklerde %13,2) iken; 2010 yılında bu oran %31,2 'ye (kadınlarda %44,2, erkeklerde %27,3) yükselmiştir. Obezitenin yaş dağılımı incelendiğinde obezite sıklığının 30'lu yaşlarda artış gösterdiği, 45-65 yaş aralığında en üst seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir. Ayrıca çocuk ve adolesanlarda da

obezitenin arttığı görülmektedir (Berberoğlu & Hocaoğlu, 2021; Satman, 2016). Sonuç olarak Türkiye’de hem yetişkinlerde hem de çocuklarda aşırı kilo ve obezite yaygınlığı önemli ölçüde artmıştır (TÜİK Kurumsal, n.d.).

Kadın vücut kitle indeksi dağılımı, 2008-2022
[15+ yaş]



Erkek vücut kitle indeksi dağılımı, 2008-2022
[15+ yaş]



Şekil 2-2: Türkiye’de Yıllara Göre Kadın ve Erkeklerde BKİ Dağılımı (2008-2022) (TÜİK Kurumsal, n.d.)

2.2 Metformin

Metformin, güçlü glukoz düşürücü etkileri, iyi bilinen güvenlik profili ve nispeten düşük maliyeti nedeniyle tip 2 diyabet tedavisinde birinci basamak tedavi yöntemi olarak tercih edilmektedir (Lamoia & Shulman, 2021). Metforminin ilk olarak 1772’lerde Galega officinalis bitkisinden ekstrakte edilerek kullanılmaya başlanmıştır. Metforminin anti-diyabetik etkisi ile ilgili gerçekleştirilen ilk araştırma Jean Sterne tarafından gerçekleştirilmiştir. Bitkisel kökenli olan bu ilaç 1994 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından klinik kullanım onayı almıştır. İlerleyen zamanlarda FDA, metformin için en çok reçetelenen ilk dört ilaçtan biri olduğuna dair bir bildiri yayınlamıştır. Buna ek olarak Dünya Sağlık Örgütü tarafından metforminin anti-diyabetik ilaç listesinde temel ilaçlar arasında yer aldığına dair açıklama yapmıştır.(Bailey, 2017).

Metforminin temel etki mekanizması karaciğerdeki hepatik glukoneogenezin baskılanmasıdır. Ayrıca metformin insülin metabolizması üzerinde de regülatör görevleri nedeniyle insülin direnci bulunan kişilerin tedavisinde etkin bit kullanım göstermektedir. Metformin regülatör etkileri gösterirken genelde kullandığı en etkili mekanizma mitokondriyal solunum zincirindeki kompleks I’in inhibisyonuna neden olarak 5’-adenozin monofosfat (AMP) ile aktive olan protein kinazın (AMPK) aktivasyonunu sağlaması aracılığıyla gerçekleşmektedir. Metformin anti-diyabetik etkilerini glukoz metabolizması üzerinden gerçekleştirmektedir. Glukoz metabolizmasına etkilerinin yanı sıra lipid metabolizması üzerinden kilo kontrolünün sağlanması, hücrel redoks dengesinin sağlanması ve protein metabolizması regülasyonu gibi çeşitli biyokimyasal süreçlerde de aktif rol oynamaktadır. (Yerevanian & Soukas, 2019).

Metformin, tip 2 diyabet tedavisinde birincil basamak tedavi olarak tercih edilen bir ilaç olarak etkilerini optimum düzeyde gösterebilmesi için terapötik aralığının iyi bir şekilde tanımlanması son derece önemlidir. Çünkü ilacın hem faydalı pleiotropik etkileri nedeniyle reçetelenme sıklığı artmakta hem de yanlış doz uygulamalarıyla birlikte özellikle böbrek fonksiyonu bozulmuş bireylerde olumsuz etkilere yol açabilmektedir. Ayrıca uzun süreli veya yanlış dozda metformin kullanımı, laktik asidoz riski ve B12 vitamini eksikliği gibi yan etkilere de neden olabilmektedir (Kajbaf et al., 2016).

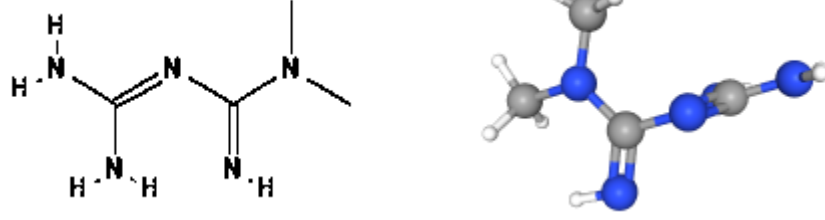
Oral yoldan uygulanan metformin, uzun süreli salınımda formülasyon göstermektedir. Metformin 12,3 bir pKa değeri ile fizyolojik pH aralığında pozitif yüklü, hidrofilik bir etki göstermektedir. Bu fizyolojik yapısı farmakokinetiğini etkileyen önemli parametrelerden biridir (González-Casanova et al., 2025a).

Metforminin oral yoldan alınmasıyla biyoyararlanım oranı yaklaşık olarak %50-60 aralığındadır. %50-60 oranında emilim sonrası ilaç portal vene geçerek karaciğerde birikmektedir. Klinikte kullanım için önerilen optimum doz miktarı genellikle 1-2 g/gün (yaklaşık 20 mg/kg-gün) aralığındadır. Uygulanan bu doz miktarı plazmada 1-40 µM arası metformin konsantrasyonunu oluşturmak için yeterli gelmektedir. Terapötik plazma aralığı yaklaşık 10-40 µM olmaktadır. Ancak ilaç karaciğerde birikim gösterdiği için karaciğerdeki konsantrasyonlar ise bu değerın 2-3 katı olabilmektedir. Metforminin uygulama dozundan ve uygulama şeklinden meydana gelen değişiklikler nedeniyle etki mekanizmasında çelişkiler bulunmaktadır. Bu nedenle metforminin etki mekanizması tam olarak netleşmemiştir çünkü yapılan birçok çalışmada terapötik düzeyin çok üstünde (mM düzeylerde) dozlar kullanılmıştır. Bu yüzden metforminin etkilerinin değerlendirilmesinde doz, uygulama yolu ve bireysel farklılıklar dikkate alınarak gerçekleştirilmesi en doğru sonuç için vazgeçilmezdir (Lamoia & Shulman, 2021).

2.2.1 Metformin Kimyasal Yapısı

Biguanid türevlerinden biri olan metformin, 1920'li yıllarda kimyasal ismiyle 1,1-dimetil biguanid olarak kimyasal bir sentetik olarak sentezlenmiştir. Kimyasal olarak 1,1-dimetil biguanid olarak bilinen metformin çoğu yerde direkt olarak ticari ismiyle de bilinmektedir.

Metforminin moleküler formülü $C_4H_{11}N_5$ 'tir. Moleküler ağırlığı ise 129,16 g/mol'dür (Q. Chen et al., 2017). Molekülün yapısal formülü ve üç boyutlu yapısı Şekil 2.3' te gösterildiği gibidir.



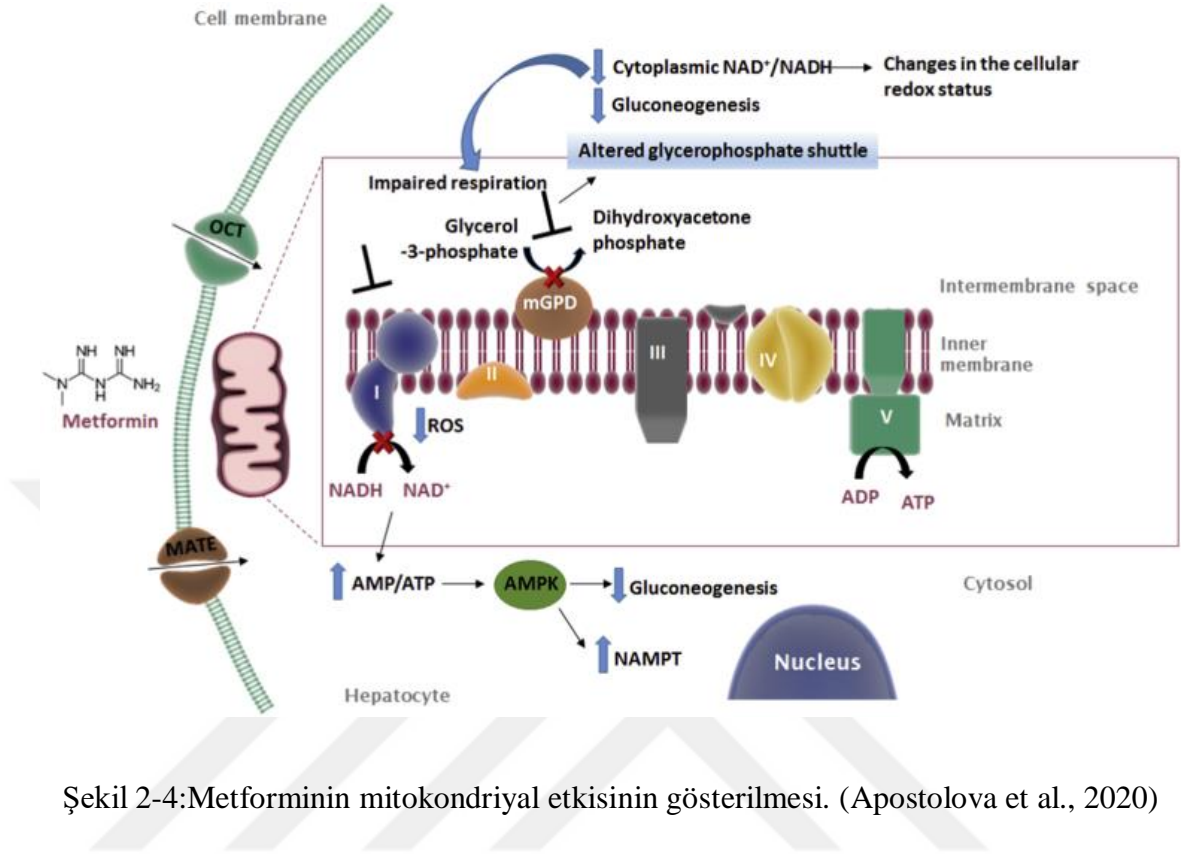
Şekil 2-3:Metforminin yapısal formülü ve üç boyutlu yapısı (Q. Chen et al., 2017)

2.2.2 Metforminin Etki Mekanizması

Metformin anti-diyabetik etkileri, güvenilir kullanım şekli, nispeten düşük maliyeti, yüksek tolere edilebilirliği ve düşük toksisite gibi etkileri nedeniyle tip 2 diyabet tedavisinde birinci basamak kullanım için sıklıkla tercih edilen bitkisel kökenli bir ilaçtır. Metforminin anti-diyabetik etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmanın incelendiği pek çok araştırma bulunmaktadır. Glukoz düşürücü etkilerinin karaciğerdeki hepatik glukoneogenezin inhibisyonu üzerinden gerçekleştirmektedir. Ancak metforminin bu etkisinin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır.

Metformin, mitokondriyal solunum zincirindeki kompleks I'ı inhibe ederek hem AMP/ATP oranında hem de NAD⁺/NADH oranında bir değişikliğe yol açmaktadır. Bu değişiklik hücrelerde enerji dengesinin sensörü olarak görev alan AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) aktivasyonunu sağlamaktadır. Metformin ana etkisini bu yol aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Ancak bazı araştırmalarda metforminin hem AMPK'ye bağımlı hem de AMPK'den bağımsız mekanizmalar aracılığıyla etki ettiği gösterilmektedir (Szymczak-Pajor et al., 2022).

Metformin AMPK'den bağımsız olarak mitokondriyal gliserol 3-fosfat dehidrogenazın (mGPD) rekabetçi olmayan bir inhibitörü olarak etki etmektedir. Bu durum gliserol-fosfat mekiğinin inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. Metforminin temel etki mekanizması Şekil 2-4'te gösterildiği gibidir (Apostolova et al., 2020).



Şekil 2-4:Metforminin mitokondriyal etkisinin gösterilmesi. (Apostolova et al., 2020)

2.2.2.1 Metforminin Hepatik Glukoneoenez Üzerine Etkisi

Hücrelerde hepatic yoldan glukoz üretimi (HGP), total endojen glukoz üretiminin yaklaşık olarak %90'ını oluşturmaktadır. HGP, hücresel ve sistemik glukoz dengesi için son derece kritik bir role sahiptir. Biyokimyasal süreçlerin sonunda elde edilen net HGP, glukoneoenez, glukoliz, glukojenoliz ve glukojen sentezi süreçlerinin tamamını kapsamaktadır. Vücuttaki net HGP dengesi glukoz metabolizması ve glisemik kontrolü için oldukça büyük bir öneme sahiptir (M. C. Petersen et al., 2017).

Tip 2 diyabet hastalığı durumunda, HGP miktarı giderek artar ve açlık hiperglisemisinin oluşmasına neden olmaktadır. Metformin kullanımı ile karaciğerde, karaciğer kinaz B1 (LKB1) aracılığıyla AMPK fosforile edilir. Bu durum glukoneojenik genlerin transkripsiyonu baskılar. Bunun sonucunda hücrelerde glukoneoenez üretimi gerçekleşmez ve T2D nedeniyle artan hiperglisemi düzeyi kontrol altında tutulur (He, 2020).

Ancak gerçekleştirilen bazı araştırmalarda, AMPK geninin silindiği fare modellerinde dahi metforminin HGP'yi inhibe ettiği sonucuna varılmaktadır. Bu durum, metforminin AMPK'den bağımsız mekanizmalar aracılığıyla HGP'yi baskıladığının kanıtı niteliğindedir. (Lamoia & Shulman, 2021).

AMPK'den bağımsız ilerleyen bir diğer mekanizma ise daha önce bahsedilen metforminin mGPD inhibitörü olarak görev aldığı ve hücre içerisindeki mitokondriyal redoks homeostazını bozarak, özellikle laktat ve gliserol gibi redoks bağımlı substratlar üzerinden glukoneogenezi baskıladığı ve bunun sonucunda HGP'yi inhibe ettiği mekanizmadır (Madiraju et al., 2014).

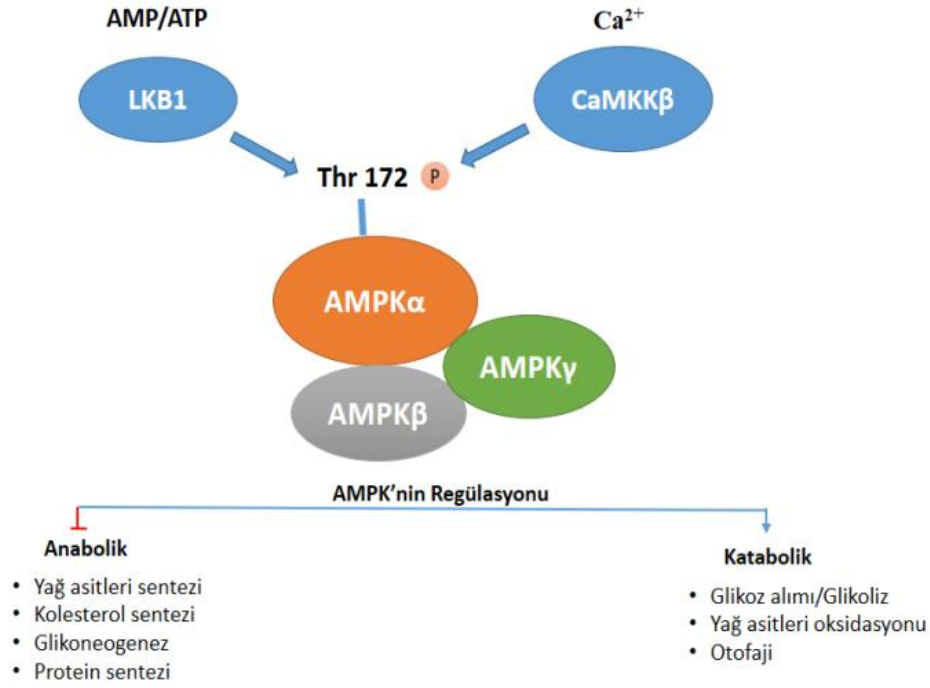
Gerçekleştirilen bir araştırmada da kültürlenmiş primer hepatosit hücreleri, farmakolojik olarak kullanılan metformin dozlarında cAMP ile uyarılan glukoz üretimini yaklaşık olarak yarı yarıya azalttığı gözlemlenmiştir. Araştırma, gözlemlenen bu etkinin pankreasın α hücrelerinden salınan glukagon hormonunun glukoneogenezi uyarmasının baskılanması sonucu oluştuğunu bildirilmektedir. Primer hepatosit hücrelerindeki reseptörlere glukagon bağlanmasıyla cAMP üretiminden sorumlu olan adenilat siklazı baskılar. Kısacası yapılan deneyler sonucunda metforminin hepatositlerde glukagon sinyalini bozduğunu ve bu şekilde glukoneogenezi önlediği belirtilmektedir (Y. Wang et al., 2019).

Özetle metformin, karaciğerde hepatik glukoneogenezin inhibisyonunu AMPK'ye bağımlı ve AMPK'den bağımsız yollar aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Metformin bu sayede, özellikle açlık glukoz seviyelerini düşürür ve insülin direnciyle ilişkilendirilen hiperglisemiyi kontrol altında tutmaktadır.

2.2.2.2 Metforminin AMPK'ye Bağımlı Etkisi

AMPK genel olarak vücutta metabolik yolların kontrolünün sağlanmasıyla enerji homeostazının korunmasında rol oynamaktadır. Bir serin/treonin kompleksi olan AMPK, 3 alt birimden oluşmaktadır. Bu birimler katalitik α - birimi (α -1 ve α -2), iskelet β - birimi (β -1 ve β -2) ve regülatör γ -birimi (γ -1, γ -2 ve γ -3)'dir (şekil 2-5).

AMPK heterodimerleri, katalitik- α alt biriminin kinaz bölgesinde bulunan treonin172 (Thr172) fosforilasyonu aracılığıyla aktive olmaktadır. AMPK aktivasyonu için son derece önemli bir yukarı yönlü kinaz olan LKB1'dir. LKB1 çeşitli sinyal yolları aracılığıyla Thr172'yi fosforile etmektedir. Ayrıca AMPK, hücrede Ca^{2+} ve DNA hasarlarının artması sonucu da aktive olabilmektedir. Thr172'nin LKB1'den bağımsız bir fosforilasyon yolu da kalsiyum/kalmodülene bağımlı protein kinaz kinaz 2 (CAMKK2) tarafından kalsiyum artmasına yanıt olarak gerçekleşmektedir (Kışmıroğlu et al., 2020).



Şekil 2-5: AMPK'nın hücresel regülasyonu (KİSMİROĞLU et al., 2020)

AMPK'ye bağımlı bir şekilde ilerleyen en bilinen mekanizma ise mitokondriyal kompleks I'in inhibisyonudur. Mitokondriyal solunum zinciri kompleks I, indirgenmiş NADH aracılığıyla ATP sentezi için gerekli olan protonların transmembrana pompalanmasında görev almaktadır. Oluşan bu mitokondriyal proton gradyanı ve sonrasında ortaya çıkan ATP, glukoneogenez reaksiyonunun enerji kaynağıdır. Metformin ise bu yolaktaki elektron taşıma zincirinin aktivitesini azaltarak $[ATP]/[ADP]$ ve $[ATP]/[AMP]$

oranlarında düşüşe sebep olmaktadır. Özellikle hepatositlerdeki bu düşük enerji yükü AMPK aktivitesi sağlamak ve enerji yoksunluğunda glukoneogenezin baskılanması ile sonuçlanmaktadır.

AMPK'ye bağımlı olarak öne sürülen bir diğer mekanizma ise glukoneogenez sürecinde görev alan HGP'yi azaltan sebep olarak bazı genlerin ifadelerinin azalmasına bağlı olarak gelişen bir süreç olduğu düşünülmektedir (Y. Wang et al., 2019).

Lipogenezde hepatik glukozun azalması ve mitokondride oksidasyonun artması sonucu karaciğerde insülin duyarlılığı artmaktadır. Metformin tedavisi uygulanan sıçanlarla gerçekleştirilen bir araştırmada, lipogenezle ilişkili bazı genlerin ekspresyonlarında azalma tanımlanmıştır. Sıçanlara uygulanan metforminin asetil-CoA karboksilaz (ACC) aktivitesini düşürdüğü sonucuna varılmıştır. ACC, asetil-CoA' dan malonil-CoA biyosentezini katalizlemektedir. Malonil-CoA molekülü ise de novo yağ asidi biyosentezi sürecinde başlangıç substratı olarak görev almaktadır. Ayrıca ACC, yağ asidi oksidasyon basamaklarında hız sınırlayıcı bir göreve sahip olan karnitin palmitoil transferaz I'in (CPT-I) inhibitörüdür. ACC inaktivasyonu aracılığıyla azalan malonil-CoA konsantrasyonu, lipid sentezinde azalma ve yağ asidi oksidasyonunda artmaya sebep olmaktadır. (Y. Wang et al., 2019).

Glukoneogenezin baskılanması sürecinde AMPK'ye bağımlı gerçekleşen önemli yollardan bir diğeri ise siklik AMP regülatör eleman bağlayıcı protein olarak bilinen CREB tarafından düzenlenen transkripsiyon koaktivatör 2 (CRTC2) ve hepatosit nükleer faktör 4 (HNF4) gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin baskılanması yoludur. Bu transkripsiyon faktörleri bazı glukoneojenik enzimlerin ekspresyonunun uyarılmasında görev almaktadırlar. (Szymczak-Pajor et al., 2022).

2.2.2.3 AMPK'den Bağımsız Etkisi ve Artan Sitozolik Durum

Metforminin önemli bir diğer etki mekanizması ise hepatik gliserol-3-fosfat dehidrogenaz 2 (GPD2) aktivitesinin baskılanması sonucu gerçekleşen artan sitozolik redoks durumudur. Metformin uygulaması gerçekleştirilen bazı araştırmalarda metforminin hücreye alımını sağlayan çoklu ilaç ve toksin ekstrüzyonu 1 (MATE1), organik katyon

taşıyıcısı 1 (OCT1) ve OCT3 taşıyıcı proteinleri aracılığıyla karaciğer, böbrek ve ince bağırsak gibi dokularda birikebilmektedir (Le et al., 2024).

Metforminin AMPK'den bağımsız gerçekleşen en önemli biyokimyasal süreçlerden biri olarak malat aspartat mekiği üzerindeki etkisi gösterilebilmektedir. Metformin malat-aspartat mekiğinin baskılanmasında görev almaktadır. Malat-aspartat mekiği ökaryotik canlılarda oksidatif fosforilasyon için yarı geçirgen bir özelliğe sahip olan mitokondriyal iç zar sistemi boyunca glukoliz reaksiyonu sırasında üretilen elektronların yer değiştirmesinde rol alan biyokimyasal bir sistemdir. Ayrıca malat-aspartat mekiği redoks tepkimesindeki dengelerin uzun süreli değişikliklerini regüle etmektedir (Farahani et al., 2025).

GPD2'nin gliserolün glukoneogeneze katılımı üzerine etkileri yadsınmaz bir öneme sahiptir. Glukoneogenez reaksiyonlarında daha fazla gliserol katılımı gerektiğinden T2DM hastalarında gliserol döngüsü artmaktadır. Ancak gliserofosfat mekiği, malat-aspartat mekiğinin hızını geçemediği durumlarda dahi metformin redoks dengesini değiştirerek hücrel kararlılığı sürdürmektedir. Bu sayede metformin, AMPK'den bağımsız olarak hücrelerde artan redoks durumunu dengeleyerek glukoneogenezi baskıladığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Szymczak-Pajor ve ark., 2022).

2.2.3 Obezite Çalışmalarında Metforminin Kullanımı

Metformin uzun süredir T2DM tedavisinde birincil basamak tedavi olarak kullanılmasına rağmen son yıllarda obezite ile ilişkili mekanizmaların araştırılmasında sıklıkla tercih edilen farmakolojik bir ajan olarak dikkat çekmektedir. Temel etki mekanizması hepatik glukoneogenezin inhibisyonu, periferik insülin duyarlılığın arttırılması ve AMPK sinyal yolunun aktifleştirilmesiyle enerji metabolizmasının regülasyonunu sağlamaktadır (Artasensi et al., 2023). Metformin, AMPK aktivasyonu aracılığıyla lipid metabolizmasının anabolik süreçlerinden lipogenez ve adipogenez inhibisyonunu sağlamaktadır. Özellikle obezite çalışmalarında metforminin, yağ dokusunun artması, trigliserid sentezi ve yağ hücrelerinin farklılaşmasının inhibisyonu gibi süreçlerdeki rolü araştırılmaktadır (van Stee et al., 2018).

Metforminin 3T3-L1 pre-adiposit hücrelerinde yapılan çalışmalarda, lipit metabolizması süreçlerinde görev alan PPAR γ , C/EBP α ve SREBP1c, FASN ve FABP4 üzerinde baskılayıcı bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Metforminin obezitenin moleküler mekanizması üzerinde yarattığı hücresel düzeydeki değişiklikler metforminin etkisini daha da ilgi çekici hale getirmekte ve metformini obezitenin anlaşılması ve tedavisindeki potansiyelini güçlendirmektedir. Ancak metforminin lipit metabolizmasına etkisinin altında yatan etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Sirtori et al., 2024). Metforminin özellikle adipogenez üzerindeki etkileri oldukça karmaşıktır. Metforminin yağ hücrelerinin oluşumunu baskıladığına dair yapılan çalışmalarda metforminin uygulama dozuna, uygulama süresine, hücre tipine ve deney koşullarına bağlı değişiklikler olduğu belirtilmektedir. Sonuç olarak, metforminin glisemik kontrol etkisinin yanı sıra lipit metabolizması üzerinde yadsınamaz bir etkisi olduğu ancak bu etkinin karmaşıklığı nedeniyle metforminin etki mekanizmasının aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (D. Chen et al., 2018a).

2.3 Lipid Metabolizması

2.3.1 Lipidlerin Görevleri ve Sınıflandırılması

Lipidler, canlı organizmalarda hayati önemlere sahip suda çözünmeyen, hidrofobik biyomoleküllerdir. Lipidler, üç temel şekilde hücresel işlevlere katkıda bulunurlar. Bunlardan ilki, hücreyi çevreleyen, seçici bir bariyer olan hücre zarının yapısını oluşturmasıdır. İkincisi, hücreye enerji kaynağı olarak enerji metabolizmasında rol almasıdır. Bir diğeri ise, hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminde rol oynamasıdır. Bu üç temel işlevin yanı sıra hormon üretimi, ısı regülasyonu, dayanıklılık gibi rolleri de bulunmaktadır (Mutlu et al., 2021).

Lipidler, LIPID MAPS sınıflandırma sisteminde, yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre 8 kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar yağ asitleri, gliserolipitler, gliserofosfolipitler, sfingolipitler, sterol lipitler, prenol lipitler, sakkarolipitler ve poliketidlerdir (Liebisch et al., 2020; Sud et al., 2007).

Özellikle yağ asitleri (FA) doymuş ve doymamış yapıda, uzun hidrokarbon zincirlerden oluşan moleküler bileşiklerdir. Yağ asitlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri, karbon atom sayısı, doymuşluk derecesi, çift bağ sayısı, hidrojen atomlarının pozisyonları ile belirlenmektedir. Doymuş ve doymamış, tekli ve çoklu, uzun, orta ve kısa olarak sınıflandırılmaktadır. Yağ asitleri glukoz gibi besinler kullanılarak De Novo olarak sentezlenebilmektedir veya hücre dışı alanlardan alınabilmektedir. Yağ asitleri, vücutta fizyolojik işlevlerin gerçekleştirilmesinde, sinyal moleküllerinin iletiminde, enerji depolanmasında görev almaktadır (Koundouros & Poulogiannis, 2020).

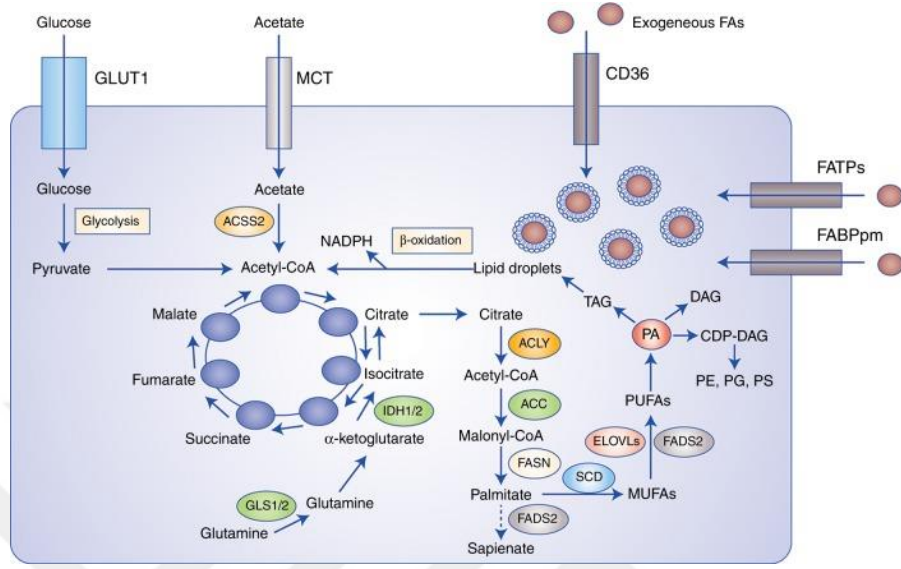
2.3.2 Lipid Metabolizmasının Ana Yolları

Lipidlerin hücresel işlevlerini yerine getirebilmesi için sindirilmesi, emilmesi, taşınması, depolanması, yıkılması ve sentezlenmesi gereklidir. Bu biyokimyasal olayların tamamına lipid metabolizması denilmektedir (Bian et al., 2021).

2.3.2.1 Lipogenez

Lipogenez, vücuda enerji alımının fazla olduğu durumlarda aktif hale gelen anabolik bir biyokimyasal süreçtir. Hücre içerisinde, dokularda, adipositlerde ve hepatositlerde de novo lipogenez meydana gelebilmektedir. Linoleik asit ve α -linolenik asit esansiyel yağ asitlerindedir. Bu nedenle Linoleik asit ve α -linolenik asit dışındaki yağ asitleri vücut tarafından sentezlenebilmektedir (Dyall et al., 2022). Asetil-CoA'nın uzun zincirli yağ asitlerine dönüşmesiyle başlayan bu süreç besinsel, hormonal ve transkripsiyonel sinyallerle düzenlenmektedir. Vücuda fazla miktarda alınan glukoz, glukoliz yoluyla pirüvata dönüştürülür. Pirüvat ise mitokondride Krebs döngüsü yoluyla asetil-CoA'ya dönüştürülür ve sitozole aktarılır (Todoric et al., 2020). Asetil-CoA'nın malonil-CoA'ya dönüşmesinde asetil-CoA karboksilaz enzimi görev almaktadır. Bu dönüşüm De Novo lipogenezin hız sınırlayıcı basamağıdır. Malonil-CoA ve yağ asidi sentaz (FASN) aracılığıyla uzun zincirli yağ asitleri oluşmaktadır (

Şekil 2-6) (Koundouros & Poulogiannis, 2020).

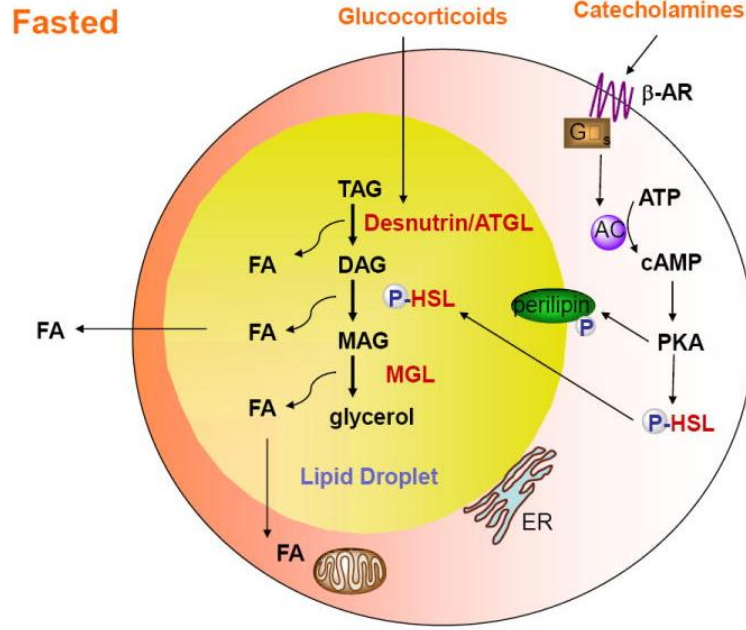


Şekil 2-6: De Novo Lipogenez Basamakları (Che et al., 2019). ACLY: Adenozin trifosfat sitrat liyaz, ACC (ACAC): Asetil-CoA karboksilaz, FASN: yağ asidi sentaz, MUFA: tekli doymamış yağ asitleri, PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri, GLUT: Glukoz taşıyıcıları, SCD1: Srearoyl-CoA desaturaz.

2.3.2.2 Lipoliz

Enerji dengesinde önemli bir role sahip olan lipoliz, trigliseritlerin yağ asitleri ve gliserole hidrolize olmasını sağlayan katabolik bir biyokimyasal süreçtir. Enerji ihtiyacının arttığı durumlarda, vücuttaki enerji ihtiyacını dengelemek amacıyla adipositlerde depolanan trigliseritlerin hidrolize olmaktadır (Palacios-Marin et al., 2023).

Depolanmış trigliseritlerin hidrolizinde bir dizi enzimatik reaksiyon görev almaktadır. Bu enzimatik süreçte hormon duyarlı lipaz (HSL), adiposit trigliserit lipaz, monoasilgliserol lipaz gibi önemli lipazlar görev almaktadır. Yağ hücrelerinin hidrolizini teşvik eden ve önemli bir katekolamin olan norepinefrin ise, adenilat siklaz uyarımıyla ikincil bir haberci olan siklik AMP (cAMP) seviyelerini arttırarak protein kinaz-A (PKA) aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu aktivasyon, ATGL ve HSL lipazlarının fosforilasyonu sağlayarak lipolitik süreci başlatmaktadır (Şekil 2-7) (Palacios-Marin et al., 2023).



Şekil 2-7: Adipositlerde Lipoliz Süreci (Ahmadian et al., 2010). TAG: Triasilgliserol, DAG: Diasilgliserol, MAG: Monoasilgliserol, β -AR: β -adrenerjik reseptör, AC: adenilat siklaz.

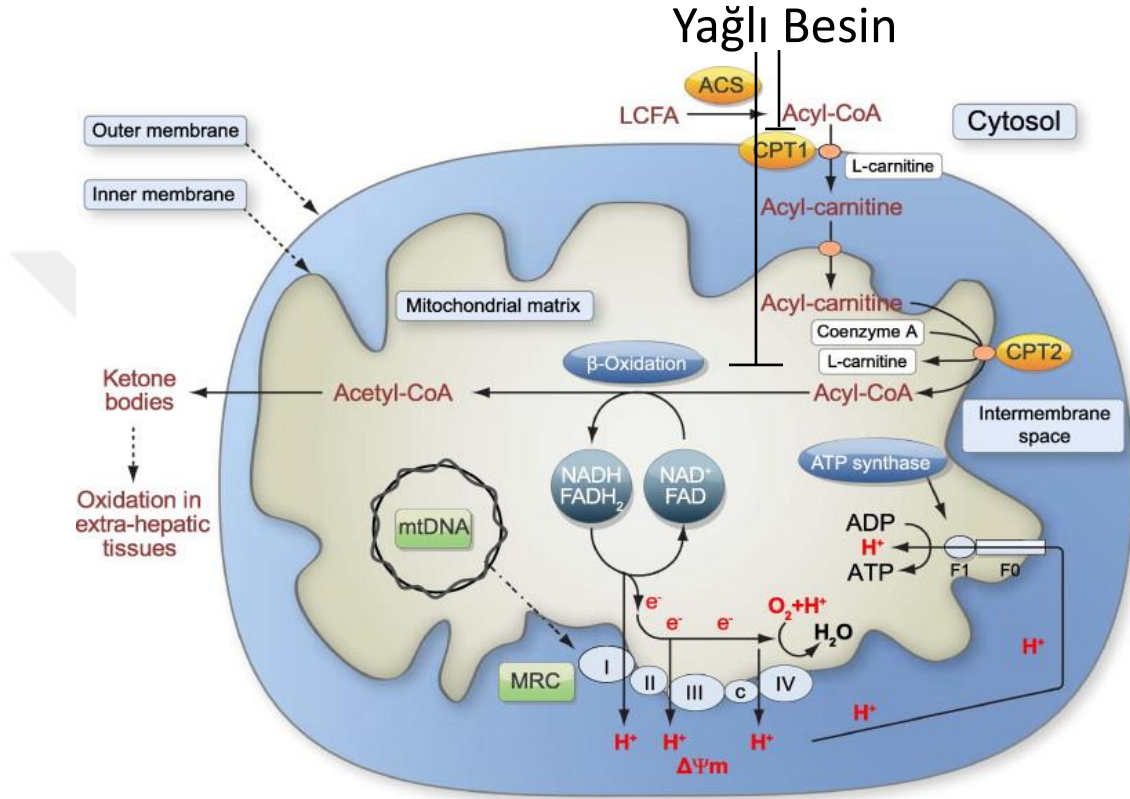
2.3.2.3 β -Oksidasyon

Serbest yağ asitlerinin, mitokondri matriksinde yıkıldığı katabolik biyokimyasal bir süreçtir. β -oksidasyon süreci hücresel enerji üretiminde temel rol oynamaktadır. Adiposit hücrelerinde lipoliz yoluyla trigliseritler serbest yağ asitlerine parçalanmaktadır. Bu serbest yağ asitleri mitokondriye iletilerek burada asetil-CoA'ya okside olmaktadır (Tahri-Joutey et al., 2021) .

Serbest yağ asitlerinin mitokondri içerisinde girmesi, karnitin taşıma sistemi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Dış mitokondriyal membranda yer alan karnitin palmitoiltransferaz I (CPT I), yağ asitlerinin mitokondriye geçişine izin vermektedir (Liao et al., 2024). Mitokondri matriksinde oksidasyona uğrayan asetil-CoA molekülleri, krebs döngüsüne girerek NADH, FADH₂ üretimini sağlamaktadır. NADH ve FADH₂ molekülleri de elektron taşıma sistemi aracılığıyla ATP üretilmesini sağlamaktadır (

Şekil 2-8). β -oksidasyon düzeyleri, hormonal sinyaller, hücresel enerji gereksinimi gibi faktörlerle ilişkilendirilmektedir. Artan adiposit durumunda, mitokondriyal β -oksidasyon

kapasitesinde azalma sebebiyle lipit birikimi, lipotoksisite görülebilmektedir (Panov et al., 2024; Smith et al., 2024).



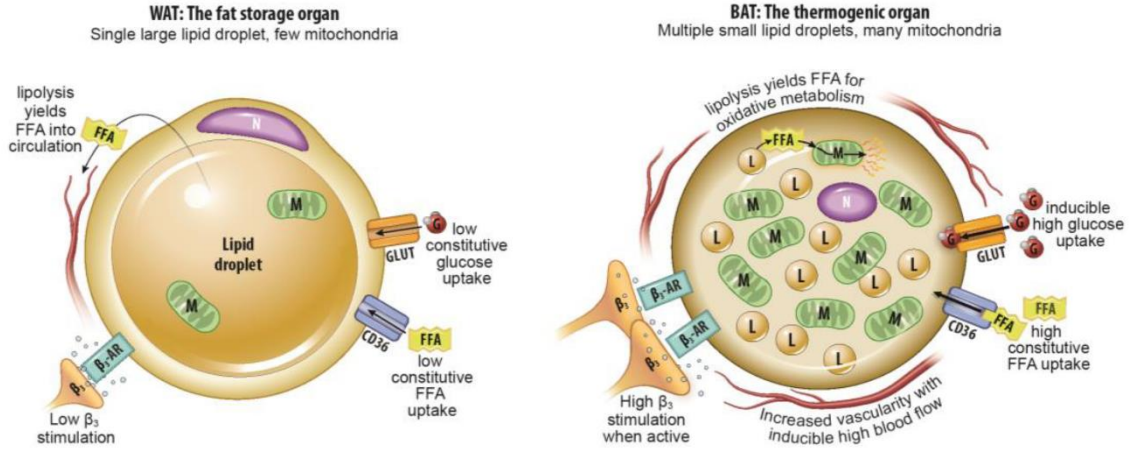
Şekil 2-8: Mitokondrilerde serbest yağ asitlerinin β -oksidasyonu. (Begrache et al., 2011)(Gürdöl, 2018 modifiye edilmiştir)

2.3.3 Adipoz Doku

Yağ dokusu diğer bir adıyla adipoz doku, vücutta enerji dengesinin sağlanması, ısı yalıtımı, dış etkenlerden korunma, hormon ve metabolitlerin salınması gibi süreçlerin yerine getirilmesinde aktif olarak görev almaktadır. Adipositlerden oluşan adipoz doku işlevlerine ve yapısal özelliklerine göre 2 farklı tipe ayrılmaktadır. Bunlar beyaz adipoz doku (WAT) ve kahverengi adipoz doku (BAT) olarak isimlendirilmektedir (Kerns & Fisher, 2020).

WAT'lar adipoz dokunun büyük bir çoğunluğu oluşturmaktadır. Asıl görevi enerji depolamak ve metabolik homeostazın düzenlenmesi gibi geleneksel yağ hücresi işlevlerini yerine getirmektir. Beyaz adipoz doku hücreleri buldukları bölgeye göre deri altı (subkutan) beyaz adipoz doku (sWAT) ve iç organların etrafında (viseral) (vWAT) olarak sınıflandırılmaktadır (Demirci & Gün, 2017).

BAT'lar ise mitokondri açısından zengin yapılardır. WAT'lar büyükçe tek bir lipid damlacığından oluşan uniloküler yapıdayken, BAT'lar multiloküler lipid damlacığından, fazla damarlaşıma ve fazla mitokondri içeren bir yapıdadır. Asıl görevi lipid oksidasyonuna bağlı termogenezi sağlamaktır. BAT'lar soğuk maruziyeti durumlarında aktifleşen ayrıştırma protein 1 (UCP-1) aracılığıyla bu görevini yerine getirmektedirler (S. X. Chen et al., 2019). Termojenik BAT ile lipid depolayan WAT arasındaki fizyolojik farklılıklar



Şekil 2-9'da gösterildiği gibidir.

Şekil 2-9: Beyaz Adipoz Doku ve Kahverengi Adipoz Dokunun Gösterilmesi (Frankl et al., 2019). FFA: Serbest yağ asidi, N: Nükleus, M: Mitokondri, G: Glukoz, L: Lipit damlacığı

2.3.4 Adipogenez

Adiposit hücrelerinin olgunlaşması ve işlevselliğini kazanması adipogenez yoluyla gerçekleşmektedir. Adipogenez süreci, fibroblast gibi pre-adipositlerin lipid

depolayabilen ve insüline duyarlı haldeki adipositlere farklılaşmasını kapsamaktadır (H. Y. Kim et al., 2024).

Adipoz dokunun genişlemesi hipertrofi ve hiperplazi mekanizmaları aracılığıyla gerçekleşmektedir. Hipertrofi var olan adiposit hücrelerinin hacimsel olarak büyümesiyle, hiperplazi pre-adiposit hücrelerinin adipositlere dönüştürülerek adiposit hücrelerinin sayıca artması olarak tanımlanmaktadır (Fang et al., 2024; Zhu et al., 2022). Adipogenez süreci hiperplazi mekanizmasıyla ilişkilendirilmektedir. Bu süreç 6 basamaktan oluşmaktadır (Tablo 2.2).

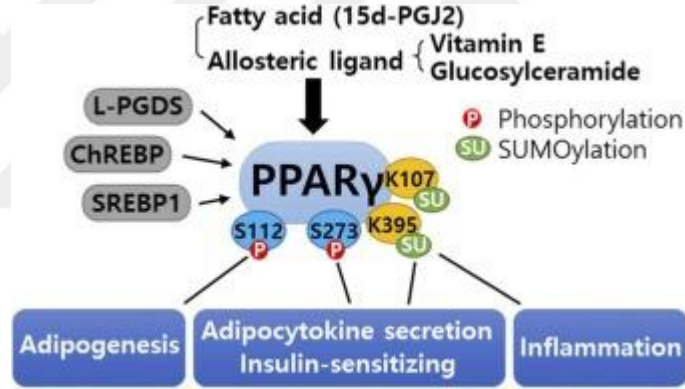
Tablo 2.2: Adipogenez Basamakları (Lefterova & Lazar, 2009)

Basamaklar	Özellikler
Mezenkimal Öncü	Proliferasyon Birden fazla soy hattına farklılaşma yeteneği
Kararlı Pre-adiposit	Proliferasyon Adiposit soyu boyunca farklılaşmaya bağlılık Fibroblasta benzer morfolojik yapı
Büyüme Durdurulmuş Pre-adiposit	Temas inhibisyonu sebebiyle proliferasyon eksikliği
Mitotik Klonal Genişleme	Hormon uyarımıyla hücre döngüsüne yeniden giriş Birkaç defa hücre bölünmesi (mitotik klonal genişleme) C/EBP β ve C/EBP δ ekspresyonunun ve aktivitesinin indüksiyonu
Terminal Farklılaşma	Hücre döngüsünün durdurulması PPAR γ ve C/EBP α ekspresyonunun indüksiyonu Adiposit genlerinin transkripsiyonel aktivasyonu
Olgun Adiposit	Adipositle ilişkili genlerin fazla ekspresyonu Transkripsiyonel olarak aktif PPAR γ , C/EBP α ve C/EBP β Yüzük morfolojisi (büyük lipid damlacıklarının hücre hacminin büyük bir çoğunluğunu kaplaması);

Pre-adipositlerin olgun adipositlere başarılı bir şekilde farklılaşması için morfolojik ve gen ekspresyonlarında çeşitli değişikliklere uğraması gerekmektedir. Adipogenez sürecinde bu değişiklikler hücrelerin kendileri arasında ve hücre ve çevre arasındaki iletişimi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu süreç çeşitli transkripsiyon faktörleri ve sinyal yolları aracılığıyla gerçekleşmektedir. Adiposit farklılaşmasında başlıca rol oynayan transkripsiyon faktörleri PPAR, C/EBP ve SREBP ailesidir (Sysoeva et al., 2023).

2.3.4.1 PPAR γ

Peroksizom proliferatör aktveli reseptörlerin (PPAR) 3 alt tipi bulunmaktadır. Bunlar PPAR α , PPAR β ve PPAR γ . 'dır. PPAR γ , transkripsiyon faktörü olarak işlev gören bir nükleer reseptördür. Adipogenez sürecinin temel transkripsiyon düzenleyicisi PPAR γ 'dır. PPAR γ , olgun adiposit fenotipini, lipogenezle ilişkili genlerin aktivasyonunu ve hücrel insülin duyarlılığını düzenlemektedir. PPAR γ , işlevsel olarak olgun adipositler oluşturmak amacıyla tüm adipojenik programı başlatmaktadır. Pre-adipositlerdeki PPAR γ aktivasyonu, hücrel trigliserit katabolizması, lipogenez, yağ asidi oksidasyonu ve glukoz metabolizmasıyla ilişkili bir dizi geni aktive etmektedir (Şekil 2-10). PPAR γ 'nın önemli bir diğer görevi ise CCAAT/güçlendirici bağlayıcı protein α (C/EBP α)'nın transkripsiyonel aktivitesini indüklemektir (Ambele et al., 2020; H. Y. Kim et al., 2024).

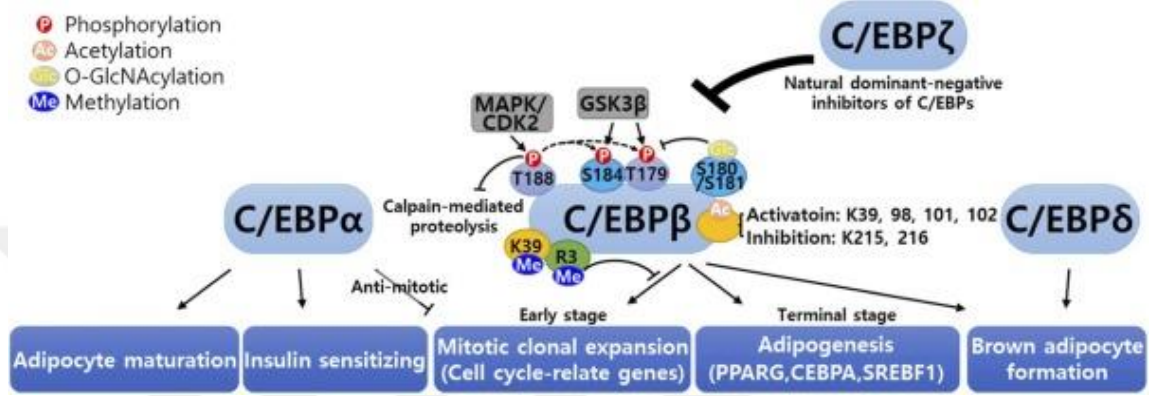


Şekil 2-10:Adipogenezde PPAR γ 'nın düzenlenmesi (H. Y. Kim et al., 2024)

2.3.4.2 C/EBP Ailesi

C/EBP ailesinin 4 üyesi adipositlerde eksprese edilmektedir. Bunlar C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ ve C/EBP ζ 'dır. C/EBP ailesi pre-adipositlerin farklılaşmasını tetiklemektedirler. CEBP farklılaşmanın başlatılması için tek başına uyarıcı bir etki göstermemektedir. Bu nedenle PPAR γ adipogenez sürecinin ana düzenleyicisi olarak C/EBP ile sinerjistik olarak hareket etmektedir. C/EBP β ve C/EBP δ , adiposit oluşumunun erken evresinde ekspresyonunu arttırarak C/EBP α ve PPAR γ ekspresyonunu başlatmaktadırlar. Özellikle C/EBP β aktivasyonu adipogenezin erken evrelerinde gerekli olan sterol düzenleyici

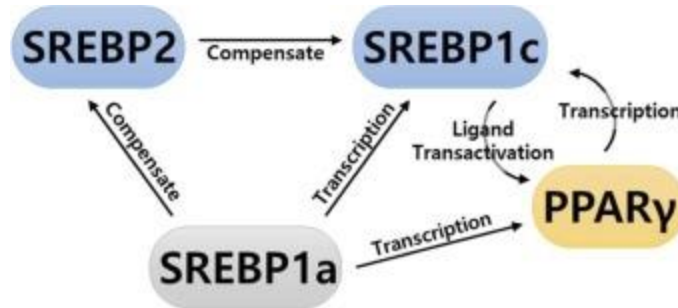
element bağlayıcı protein 1 (SREBP1) ile ilişkilendirilmektedir. C/EBP α ise proliferasyonun durması üzerine adiposit olgunlaşmasında rolü olan genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlayarak klonal büyümenin sonlanmasını sağlamaktadır (Şekil 2-11) (H. Y. Kim et al., 2024; Sysoeva et al., 2023).



Şekil 2-11: Adipogenezde C/EBP'lerin düzenlenmesi (H. Y. Kim et al., 2024)

2.3.4.3 SREBP'ler

SREBP ailesinin 3 izoformu (SREBP1a, SREBP1c ve SREBP2) vardır. SREBP'ler lipogenez ve kolesterol sentezinde rol oynamaktadırlar. Özellikle SREBP1c, adiposit farklılaşmasında görev almaktadır. Özellikle SREBP1c, adiposit farklılaşmasında görev almaktadır. C/EBP'ler tarafından indüklenerek PPAR γ ligandı aracılığıyla PPAR γ 'ı transaktifleştirerek adiposit farklılaşmasını teşvik etmektedir. SREBP1 adipogenez için vazgeçilmezdir. Çünkü PPAR γ ile pozitif feedback döngüsü oluşturmaktadır. SREBP1a ise özellikle adipogenezin erken basamaklarında eksprese edilmektedir (Şekil 2-12). GSK3 β -C/EBP β yolu ile indüklenmektedir ancak PPAR γ tarafından transaktif edilmemektedir (H. Y. Kim et al., 2024).



Şekil 2-12: SREBP'ler ve PPAR γ arasındaki etkileşim (H. Y. Kim et al., 2024)

Bu transkripsiyon faktörleri pre-adipositlerin olgun adipositlere dönüşümünün temelini oluşturmaktadır. Adipogenez sürecinin başlatılmasında ve sürdürülmesinde önemli role sahiptirler. Ancak bu transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon sırası, hücre dışı sinyallerle ilişkisi, diğer faktörlere (farmakolojik uygulamalar) verdikleri yanıtın altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamaktadır. Bu nedenle adipogenez mekanizmalarına yönelik daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Das et al., 2024; Kazemi et al., 2025).

2.4 Farklılaştırmanın Moleküler Mekanizması

Genellikle *in vitro* adipogenez mekanizmalarını daha detaylı incelemek amacıyla çalışmalarda iyi tanımlanmış bir model olan fare embriyosundan izole edilmiş 3T3-L1 pre-adiposit hücre hattı yaygın olarak kullanılmaktadır. 3T3-L1 hücreleri fibroblast benzeri bir morfoloji göstermektedir. Hücreler uygun indükleyiciler yardımıyla olgun adipositlere farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Çil & Soysal, 2024).

Olgun adipositlere farklılaşma, hücre dışı sinyal yollarının hücre içi sinyal yollarını uyarması, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve lipid metabolizmasıyla ilişkili genlerin yeniden programlanmasıyla karakteri edilen bir süreçtir. Hücrelerin iç homeostazının sağlanması, insülin sinyalizasyonunda meydana gelen değişiklikler ve lipid metabolizmasının yeniden yapılandırılması gibi bir takım biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir (González-Casanova et al., 2025b).

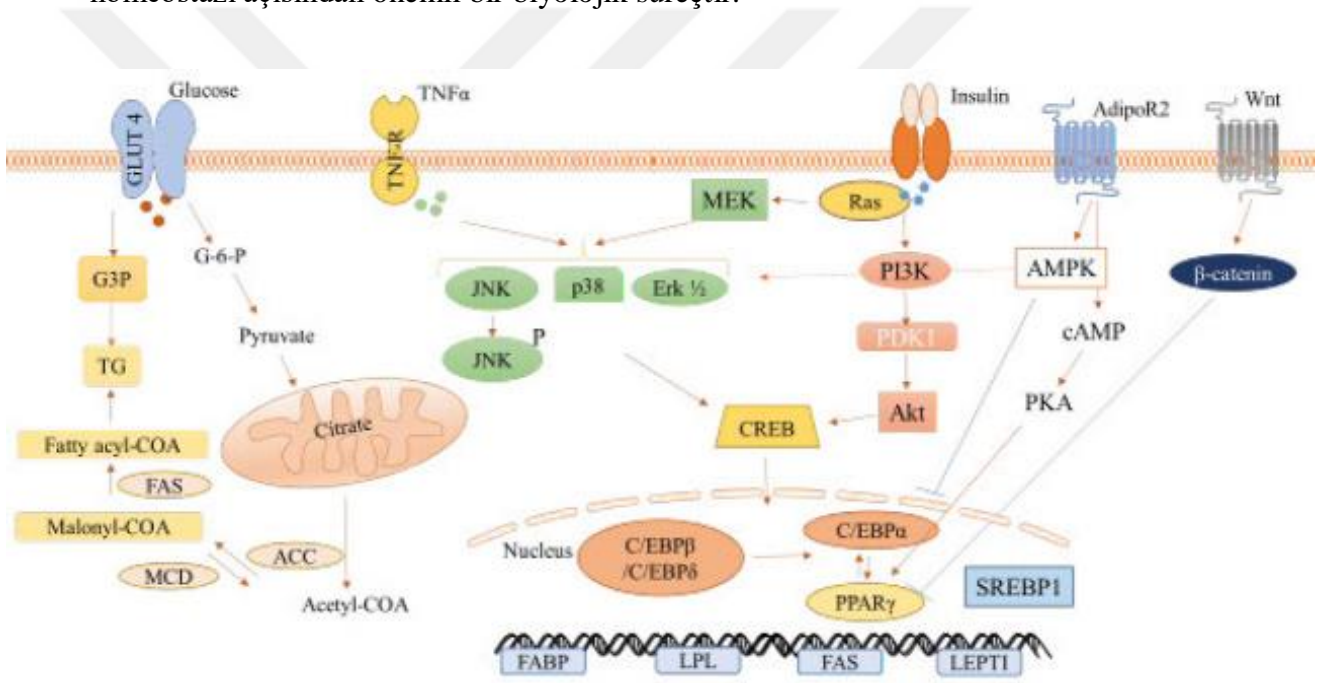
Hücrelerin farklılaştırılması sürecinde genel olarak fosfodiesteraz inhibitörü olarak görev yapan 3-isobütil 1-metilksantin (IBMX), glukokortikoid görevi yapan Deksmetazon (DEX) ve insülin kullanılmaktadır. Bu farklılaşma indükleyici ajanlar hücrelerin adipogenez sürecindeki mitotik klonal genişleme fazına geçişini sağlamaktadırlar. Ardından farklılaşma sürecinde aktif olarak görev yapan transkripsiyon faktörleri eksprese edilmektedir. IBMX, hücre içerisindeki cAMP düzeylerini arttırarak Protein Kinaz A yolunu aktive etmektedir. DEX, glukokortikoid reseptörlere bağlanarak hücrede nükleer transkripsiyonel yanıtı başlatmaktadır. İnsülin ise PI3K/Akt yolunu aktive ederek hücresel metabolik yeniden programlama süreçlerini başlatmaktadır.

Farklılaşmanın erken aşamalarında ilk olarak C/EBP β ve C/EBP δ transkripsiyon faktörleri uyarılmaktadır. İlerleyen aşamalarda bu iki transkripsiyon faktörleri PPAR γ ve C/EBP α 'nın indüklenmesinde rol oynamaktadır. Bu transkripsiyon faktörlerinden PPAR γ , farklılaşma sürecinin merkezinde görev almaktadır. Farklılaştırmadan sorumlu diğer genlerin doğrudan uyarılmasını sağlamaktadır. Ayrıca fibroblast hücrelerinde adiposit morfolojisinin kazanılmasını sağlamaktadır. Farklılaşan olgun adipositlerde belirgin morfolojik değişiklikler gözlemlenmektedir. Hücreler iğsi yapıdan daha yuvarlak bir yapıya geçmektedir. Sitoplazmada lipid damlacıkları birikir, çekirdek periferine doğru lokalize olmaktadır. Hücrelerde morfolojik değişikliklerin yanı sıra metabolik değişikliklerde meydana gelmektedir. Hücrelerin glukoz alımı artmakta, mitokondriyal aktivite yükselmekte ve lipogenez kapasite güçlenmektedir. C/EBP α ile PPAR γ pozitif feedback mekanizmaları aracılığıyla birbirlerinin ekspresyonlarını yukarı yönlü regüle etmektedirler (Guru et al., 2021).

İnsülin aracılığıyla aktiveleşen PI3K/Akt sinyal yolu hücrede glukoz alımının artırılmasını ve lipogenezle ilişkilendirilen genlerin ekspresyonlarını uyarılmasını sağlamaktadır. AMPK yolu ise hücresel enerji sensörü olarak görev yapmaktadır. Enerji yetersizliği durumlarında lipogenez ve adipogenez süreçlerinin aşağı yönlü regülasyonunu sağlamaktadır (Guru et al., 2021; Kazemi et al., 2025).

Farklılaşma sürecinin inhibisyonunu sağlayan başka sinyal yolları da bulunmaktadır. Wnt/ β -katenin, TGF- β /Smad ve MAPK/ERK sinyal yolları farklılaşmanın negatif düzenleyicileri olarak görev almaktadırlar (Song & Kuang, 2019).

Özetle, pre-adiposit hücrelerinin adipositlere farklılaşma süreci; hücre dışı sinyal yollarının erken evrelerde transkripsiyon faktörlerini aktive etmesiyle başlamaktadır. PPAR γ ve C/EBP α gibi farklılaşmanın önemli düzenleyicilerinin aktive olmasıyla birlikte, lipid metabolizmasındaki hedef genlerin ekspresyonları düzenlenir. Bu süreç, hücrelerin morfolojik olarak değişikliklere uğraması ve fonksiyonel olarak olgun adipositlere dönüşmesiyle tamamlanmaktadır. Farklılaşma sonunda pre-adiposit hücreler, lipid biriktirme kapasitesine sahip, metabolik olarak aktifleşmiş adiposit hücrelerine dönüşümü gerçekleştirmiş olmaktadır. Farklılaşma, enerji metabolizması ve doku homeostazı açısından önemli bir biyolojik süreçtir.



Şekil 2-13: Pre-adipositlerin Adipositlere Farklılaştırılmasının Şematik Olarak Gösterilmesi (Kazemi et al., 2025).

3 MATERYAL METOD

3.1 Kullanılan Materyaller

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde verilmiştir.

3.1.2 Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde verilmiştir.

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar Ekler bölümünde verilmiştir.

3.1.4 Kullanılan Tamponlar

Çalışmalarda kullanılan tamponların içeriği Ekler bölümünde verilmiştir.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Hücre Kültürü

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda 3T3-L1 (ATCC® CL-173™) hücre hattı %10 BCS (Bovine Calf Serum-Sigma Aldrich. 12133C-USA), %1 Penisilinin-Streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Gibco™) medyası içerisinde 37°C, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Hazırlanan medyalar 0,22 µM por çaplı filtre ile steril edilerek kullanılmıştır.

3.2.2 Hücrelerin Çözülmesi

Dondurularak saklanan hücreler iki farklı şekilde gerçekleştirilmektedir. İlki santrifüjlü hücre açma yönteminde dondurma besiyerinde bulunan hücreler hızlıca çözündürülerek 1:1

oranda besiyeri eklenerek 4 dk, 2500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Pellet taze besiyeri ile çözülerek T25 flasklara ekim gerçekleştirilmiştir. Hücre kapları 37°C, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir, birkaç saat sonra hücrelerin morfolojileri ve yapışma durumları kontrol edilmiştir. Diğer bir yöntemde ise dondurma besiyerindeki hücreler hızlıca çözdürülerek direkt olarak besiyeri eklenmiş hücre kaplarına ekim gerçekleştirilmiştir. Hücre kapları 37°C, %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilir, birkaç saat sonra hücrelerin morfolojileri ve yapışma durumları kontrol edilmiştir.

3.2.3 Hücrelerin Dondurulması

3T3-L1 hücre hattını stoklayarak saklamak amacıyla hücre dondurma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücre kültür kaplarında büyütülen hücrelerin besiyeri atılarak fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkama yapılmıştır. PBS uzaklaştırılarak adherent karakterli hücreleri kültür kabının tabanından kaldırmak için Tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) uygulanmıştır. Kültür kabı 5 dk, 37 °C inkübatörde bekletilerek hücreler kaldırılır. Işık mikroskopunda kalktığı gözlemlenen hücreler Tripsin-EDTA aktivitesini inhibe etmek için 1:1 oranında besiyeri eklenmiştir. Kültür kabı bu karışımla yıkanarak 15 ml'lik falkona toplanarak 4 dk, 2500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Pellet dondurma besiyeri ile (Freezing media) homojen bir hale gelene kadar pipetaj yapılmıştır. Ardından kriyo tüplere alınarak etiketlendik sonra -80 °C veya sıvı azot ortamında saklanmıştır.

3.2.4 Hücrelerin Alt Kültüre Alınması (Pasajlanması)

Hücreler kültür kabında yaklaşık olarak %80 yoğunluğuna ulaşınca pasajlanmıştır. Pasajlama işleminde öncelikle kültür kabındaki besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. PBS uzaklaştırıldıktan sonra Tripsin-EDTA eklenerek hücreler 5 dk 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda mikroskop altında kontrol edilerek 1:1 oranda besiyeri eklenerek Tripsin-EDTA inhibe edilmiştir. Kalkan hücreler 15 ml'lik falkonda toplanarak 4 dk 2500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Pellet besiyeri ile pipetajlanarak homojenize edilmiştir. Hücreler, hemositometre yardımıyla sayılarak ekim gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 Hücrelerin Farklılaştırılması

3T3-L1 hücrelerinin yoğunluğu %60-70'e ulaştığında, hücelere farklılaştırma protokolü uygulanmıştır. 3T3-L1 pre-adiposit hücrelerinin adipositlere farklılaşması için hücreler ilk olarak pre-diferansiyasyon ortamında inkübe edilmiştir. Pre-diferansiyasyon ortamında; %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 Penisilinin-Streptomisin içeren DMEM besin ortamına ek olarak 1,0 µM Deksametazon (DEX), 0,5 mM 3-isobütil 1-metilksantin (IBMX) ve 1,0 µg/ml insülin bulunmaktadır. Hücreler, pre-diferansiyasyon ortamında 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler, diferansiyasyon ortamına alınır. Diferansiyasyon ortamında ise %10 FBS ve %1 Penisilinin-Streptomisin içeren DMEM besin ortamına ek olarak 1,0 µg/ml insülin bulunmaktadır. Hücreler diferansiyasyon ortamında ise 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler her gün inverted mikroskop yardımıyla gözlemlenmiştir ve iki günde bir diferansiyasyon ortamı yenilenmiştir. Bu süreç hücrelerin yoğunluğunun artmasına bağlı olarak ortalama 6-10 gün sürmüştür.

3.2.6 Oil Red O Boyama

Pre-adiposit 3T3-L1 hücreleri 6 kuyucuklu hücre plakalara ekilerek farklılaştırılma protokolü uygulanmıştır. Farklılaşan 3T3-L1 hücrelerinin bulunduğu 6 kuyucuklu hücre plakalarındaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2 mL 1X PBS ile 2 kere yıkandıktan sonra 2 ml %4'lük PFA (Paraformaldehit) ile 45 dakika boyunca fikse edilmiştir. İnkübasyon sonunda fiksatif uzaklaştırılarak 2 mL 1X PBS ile 1 kere yıkanmıştır. Hücreler 2 mL %60 izopropanol ile 5 dakika inkübe edildikten sonra izopropanol uzaklaştırılarak kuyucukların tamamen kuruması için beklenmiştir. Daha sonrasında hücelere 1 mL %0,6 Oil Red O boyama solüsyonu eklenerek 15 dakika boyunca karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir. En son aşamada boya uzaklaştırılarak hücreler 2 mL saf su (dH₂O) ile 3-5 kere yıkarak 2 mL %70 gliserol eklenip Floresan ataçmanlı invert mikroskopta (IX71-Olympus) görüntü alınmıştır.

3.2.7 BODIPY Boyama

Lipid hücrelerini boyama amacıyla tercih edilen bir boyama yöntemi olan BODIPY kullanılmıştır. 60 mm'lik hücre kültürü kaplarına kontrol ve farklılaştırma için deney

ekimi gerçekleştirilmiştir. Farklılaşma süreci sonunda BODIPY gerçekleştirilmiştir. BODIPY boyama için besiyeri uzaklaştırılarak hücreler 1 kere 1X PBS ile yıkanmıştır. PBS uzaklaştırılarak %4'lük PFA ile karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda PFA uzaklaştırılarak hücreler 1 kere 1X PBS ile yıkanmıştır. %0,1 Triton X-100 ile karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda Triton X-100 uzaklaştırılarak hücreler 2 kere 1X PBS ile yıkanmıştır. Hücreler 1X PBS içerisine eklenmiş BODIPY boya ile karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda Floresan ataçmanlı invert mikroskopta (IX71-Olympus) görüntü alınmıştır.

3.2.8 İmmünofloresan Boyama

6 kuyucuklu hücre plakalarına ekilen pre-adiposit 3T3-L1 hücrelerine farklılaştırma protokolü gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu plakada farklılaşan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak 3 kere PBS ile yıkanmıştır. Soğuk metanol eklenerek 10 dk fiksasyona bırakılmıştır. Metanol uzaklaştırılarak hücre plakası kurumaya bırakılmıştır. Ardından tekrar 3 kere PBS ile yıkanarak Triton X-100 solüsyonu eklenip 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda tekrardan 3 kere PBS, 3 kere de PBB ile yıkanmıştır. Yıkamalar sonunda hücelere immünofloresan bloklama tamponu eklenerek oda sıcaklığında çalkalayıcıda 45-60 dk inkübe edilmiştir. Ardından 3 kere PBB ile yıkanan hücre plakalarına 1:50 oranında hazırlanan FABP4 primer antikoru eklenmiştir. Hücre plakası ıslak filtre kağıdı ile kapatılarak karanlıkta +4°C'de çalkalayıcıda gece boyunca inkübasyona bırakılır. Ertesi gün 3 kere PBB ile yıkanarak DRAQ5 (1:1000) eklenmiş sekonder antikorla karanlıkta +4°C'de çalkalayıcıda 60 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 3 kere PBB ile yıkanan plakaya PBS damlatılarak Floresan ataçmanlı invert mikroskopta (IX71-Olympus) görüntü alınmıştır.

3.2.9 MTT Hücre Canlılığı Testi

MTT hücre canlılığı testi için pre-adiposit 3T3-L1 hücreleri 96 kuyucuklara her kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde ekildikten sonra farklılaştırma protokolü uygulanmıştır. Tüm farklılaştırma sürecinde farklılaştırma besiyerlerine ek olarak artan dozlarda (0, 1mM, 2,5 mM, 5mM, 7,5mM, 10mM, 15mM) metformin uygulaması yapılmıştır. Süreç sonunda hücelere 10 µl MTT ajanı ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazolium

Bromide) eklenerek, plakalar 37 °C’de karanlık ortamda 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda MTT ajanı uzaklaştırılarak, oluşan formazan kristallerine zarar vermeden 100 µl DMSO eklenmiştir. Daha sonra 570 nm – 655 nm ikili dalga boyunda absorbands ölçülmüştür ve elde edilen veriler kullanılarak kontrol hücrelerine göre doza bağlı yüzde canlılık hesaplanmış ve Graphpad 8.0.1 programı kullanılarak grafikler oluşturulmuştur.

3.2.10 Memeli Hücrelerinden Protein İzolasyonu

Lipid hücrelerinden protein izolasyonu, hücreler uygun kültür kaplarında farklılaştırıldıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Farklılaşma tamamlandıktan sonra hücre kaplarındaki besi yeri uzaklaştırılmış ve 1 ml soğuk 1X PBS ile yıkanmıştır. 1X PBS eklenerek hücre kazıyıcısı ile hücreler dikkatlice kazınıp 1,5 ml’lik eppendorf tüplerine alınmıştır. Hücre kabının üzerine tekrar 0,5 ml soğuk 1X PBS eklenerek kazıyıcı ile tüm hücreler toplanmış ve eppendorfa alınmıştır. Hücreler santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp, pelletin yoğunluğuna göre 30-50 µl hücre lizis tamponu (CLB) eklenmiştir. Hücreler oda sıcaklığında 20 dk çalkalayıcıda inkübe edildikten sonra 16.000 x g’de 20 dakika +4 °C’de tekrar santrifüjlenerek süpernatant total protein lizatı olarak yeni bir eppendorf tüpüne alınarak -20 °C’de saklanmıştır. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için Bradford yöntemi uygulanmıştır.

3.2.11 Bradford Protein Miktar Tayini

Lipid hücrelerinden izole edilen proteinlerin miktarlarının belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bradford yönteminde artan miktarlarda (1,5 µg, 3 µg, 4,5 µg, 6 µg, 7,5 µg) Bovine Serum Albümin (BSA) eklenerek standart oluşturulmuştur. Konsantrasyonu ölçülmek istenen örneklerden 1 µl alınarak 96 kuyucuklu plakalara eklenmiştir. Tüm kuyucuklara 200 µl Bradford Reagent solüsyonu eklenerek, karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında mikropłaka okuyucuda 595 nm dalga boyunda absorbands ölçümü yapılmıştır. BSA örneklerinin absorbands değerleri kullanılarak standart eğri grafiğı oluşturulmuştur. Standart eğri grafiğinin denklemine göre protein örneklerinin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.12 İmmüno blotlama

3.2.12.1 SDS Poli akrilamid Jelin Hazırlanması

Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre birbirinden ayrılması amacıyla SDS-PAGE yapılmıştır. Elektroforez aşamasında hazırlanan yürütme ve yükleme jellerinin içeriği Ekler bölümünde Tablo D.2’de verilmiştir. Önce %12’lik yürütme jeli belirtildiği gibi hazırlanmış ve 1 mm boşluğa sahip camlar arasına dökülerek üzeri izopropanol ile tamamlanmıştır. Yürütme jeli polimerleştiğinde izopropanol uzaklaştırılarak, %4’lük yükleme jeli hazırlanarak yürütme jelinin üzerine dökülmüştür. Uygun taraklar cam arasına yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklenmiştir.

3.2.12.2 Protein Örneklerinin Hazırlanması ve SDS-PAGE’e yüklenmesi

Konsantrasyonları belirlenerek 40 µg hazırlanan protein örnekleri 5X Laemmlı Yükleme tamponu ile 4:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır. Protein denatürasyonu için örnekler 95 °C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. Önceden hazırlanan jelden tarak çıkarılarak dikey elektroforez düzeneğine yerleştirilmiştir. Elektroforez tankının içerisine Ekler bölümünde Tablo D.1’de belirtilen şekilde hazırlanan SDS PAGE Yürütme tamponu eklenmiştir. Jeldeki ilk kuyucuğa protein marker, diğer kuyucuklara örnekler yüklenerek 70-90 Voltta yaklaşık 2 saat yürütme gerçekleştirilmiştir.

3.2.12.3 Protein Örneklerinin Membrana Transferi ve Bloklanması

Proteinlerin yürütülmesi işleminin sonunda camlar birbirinden ayrılarak jel çıkarılıp, yükleme jeli dikkatlice kesilmiştir. PVDF membran metanolle aktifleştirilmiştir. Transfer düzeneğinde kullanılan bütün malzemeler transfer tamponuna alınarak hazırlanmıştır. Transfer düzeneği için sandviç arasına sırasıyla sünger – filtre kağıdı- membran- jel- filtre kağıdı- sünger koyulmuştur. Sandviç, içi transfer tamponu ile doldurulmuş tanka alınarak 300 mA akımda protein büyüklüklerine göre 20 -90 dakika arasında buzun içerisinde transfer edilmiştir. Transfer işleminden sonra membran %5’lik bloklama sütüne alınarak çalkalayıcıda oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

3.2.12.4 Antikor Uygulanması ve Görüntü Alınması

Çalışmada kullanılan tüm primer ve sekonder antikorlar %5'lik bloklama sütü ile hazırlanmıştır. Primer antikorlar 1:1000, sekonder antikorlar ise 1:3000 oranında hazırlanmıştır. Bloklanan membranlar primer antikora alınarak +4 °C'de gece boyunca rollerde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün membranlara 3 kere 10 dakika TBS-T ile primer yıkamalar gerçekleştirildikten sonra primer antikorla uyumlu HRP bağlı sekonder antikora alınarak yine +4 °C'de gece boyunca rollerde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası membranlara 3 kere 10 dakika TBS-T, 1 kere 5 dakika TBS ile sekonder yıkamalar gerçekleştirilmiştir. Görüntü almak için Ekler bölümünde Tablo D.3'te belirtildiği gibi hazırlanan kemiluminesans A ve B tampon çözeltileri karıştırılarak membran bu çözelti içerisinde 2 dakika inkübe edilmiştir. Membranların, ChemiDoc (BioRad) kemiluminesans görüntüleme cihazıyla çekimi gerçekleştirilmiştir.

3.2.12.5 Membranların Striplenmesi

Immunoblotlama işlemi sonrası membrandaki proteinlere bağlı antikorların ayrıştırılması ve membrana farklı bir antikor uygulanması amacıyla membranlar striplenmiştir. Stripleme işlemi için görüntü alınan membranlar 2 kere 8 dakika stripleme tamponu, 2 kere 5 dakika 1X PBS, 2 kere 8 dakika TBS-T ile çalkalayıcıda yıkanmıştır. Yıkama işleminin sonunda membranlar %5'lik bloklama sütüne alınarak çalkalayıcıda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bloklamadan sonra standart immünoblotlama adımları uygulanmıştır.

3.2.13 Memeli Hücrelerinden RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

3T3-L1 hücrelerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmek amacıyla 60 mm hücre kültürü kaplarına kontrol, farklılaştırma ve farklılaştırma+metformin uygulaması kondisyonları için ekim gerçekleştirilmiştir. Farklılaştırma süreci sonunda PureZol RNA İzolasyon Ajanı (BioRad, ABD) ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon için öncelikle besiyeri uzaklaştırılarak PureZol ajanı eklenmiştir. PureZol ile hücrelerin kalkması ve parçalanması sağlanmıştır. Kalkan hücreler 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne alınarak 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Hücre lizatının üzerine kloroform eklenmiş ve 15 saniye boyunca up-down çalkalanmıştır. 5 dakika oda sıcaklığında

inkübasyondan sonra 12.000 x g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan üç fazdan en üstteki şeffaf faz dikkatlice çekilerek yeni bir eppendorf tüpüne alınmış ve üzerine izopropanol eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 12.000 x g'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet %75 etanolle yıkanmıştır. 7.500 x g'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak, pellet, tüpün ağzı açık bırakılarak 5 dakika kurutma yapılmıştır. Pellet RNaz içermeyen su ile çözülerek -80 °C'de saklanmıştır.

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu spektrofotometre cihazıyla ölçülmüş %1,5'lük agaroz jelde yürütülerek örnekler degradasyon bakımından kontrol edilmiştir. İzolasyon sonrası RNA örneklerinden cDNA sentezlenmiştir. cDNA sentezi için iScript cDNA Sentez Kiti (BioRad) kullanılmıştır. Üreticinin talimatlarına göre RNA kalıbı, reverse transkriptaz ve reaksiyon karışımı PCR tüpüne alınarak termal döngüleyicide 25 °C'de 5 dk, 46 °C'de 20 dk, 95 °C'de 1 dk inkübe edilmiştir. Sentezlenen CDNA örnekleri -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.14 Gradient Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Çalışmalarda kullanılan primerlerin (Tablo 3.1) optimum bağlanma sıcaklıklarının tespit edilmesi için gradient PCR uygulanmıştır. PCR'da DNA kalıbı olarak cDNA'ya çevrilen kontrol grubu örnekleri kullanılmıştır. Örnekler her bir primer için Ekler bölümünde Tablo D.4'te belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Primerlerin optimum bağlanması sıcaklıkları için 65,0°C, 63,8°C, 62,0°C, 59,1°C, 55,7°C, 52,9°C, 51,0°C ve 50,0 °C sıcaklıkları kullanılmıştır. Hazırlanan örneklere termal döngüleyicide (BioRad T100 Thermal Cycler) Ekler bölümünde Tablo D.5'te belirtilen protokol ile Gradient PCR gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1: qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan primerler

Gen Adı	Primer Dizileri
β -Actin	F: 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3' R: 5'- TGCATTGTTCAAGGAAGTTCCTT-3'
PPAR γ	F: 5'-TGTCGGTTTCAGAAGTGCCTTG-3' R:5'- CTCCAGTGATATCGACCAGCTGAA-3'

FASN	F: 5'-GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT-3' R: 5'- CTGGGCTCTATGGATTACCCA-3'
SREBP-1c	F: 5'-CGGCTGTTGTCTACCATAAGCTG-3' R:5'-GGCAACACTGGCAGAGATCTATG-3'
C/EBP α	F:5'- CAAGAACAGCAACGAGTACCG-3' R:5'-GTGCTGGAGTTGACGAGTGAC-3'
IRS1	F:5'-CGATGGCTTCTCAGACGTGC-3' R:5'-CACCACGGAGTCATCCACTTGC-3'
IL-6	F: 5'-ACCAAACCTGGATATAATCAGGAAA3-' R:5'-GAGAGCATTGGAAATTGGGG-3'
TNF- α	F:5'-AACTAGTGGTGCCAGCCGAT-3' R:5'-CTTCACAGAGCAATGACTCC-3'
GLUT4	F: 5'-GTAACCTCATTGTCGGCATGG-3' R: 5'- AGCTGAGATCTGGTCAAACG-3'

3.2.15 Kantitatif-Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Hücrelerdeki gen ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla cDNA örnekler Tablo 3.1'de belirtilen primerler ve SYBR Green PCR karışımı qPCR striplerinde hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler CFX Connect Real Time PCR (BioRad) cihazına yerleştirilerek 63,8 °C'de bağlanma sıcaklığında qRT-PCR gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen deney sonrası elde edile CT değerleri ve reaksiyon verimi kullanılarak PFAFFL yöntemine göre hücrelerdeki gen ekspresyon değerleri hesaplanmıştır. Deneyler Ekler bölümünde Tablo D.6'da belirtilen protokole göre en az iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

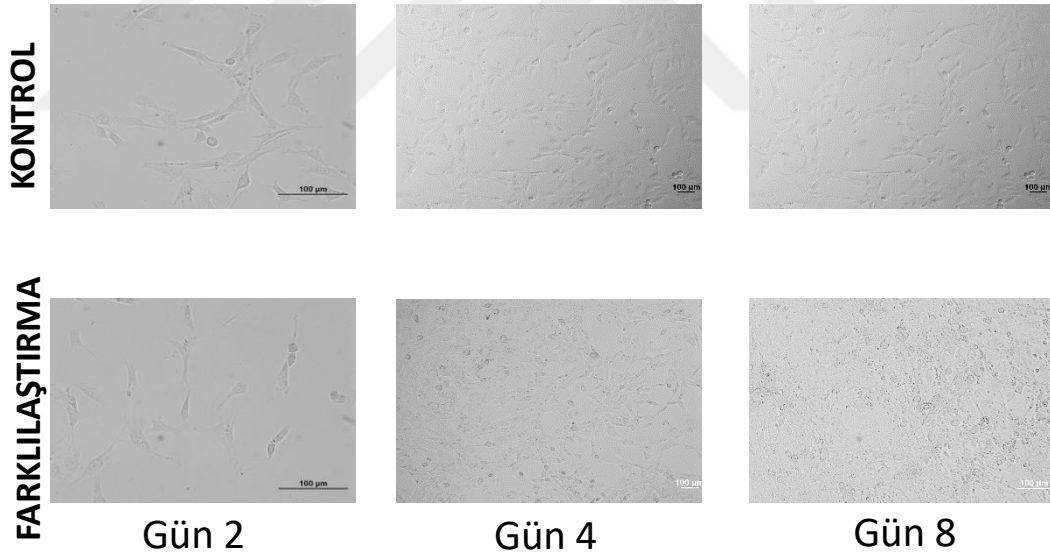
3.2.16 İstatiksel Analiz

Deneyler en az üç kez tekrarlanmış ve ortalamalı alınmıştır. Deneysel sonuçlar GraphPad Prism 8.0.1 versiyon kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. İmmünoblotlama sonuçları Image J analiz programı aracılığıyla sayısal olarak hesaplanmış ve her bant profili house-keeping değerlerine göre normalize edilerek 2-way ANOVA Bonferroni çoklu karşılaştırma analizi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

4 SONUÇLAR

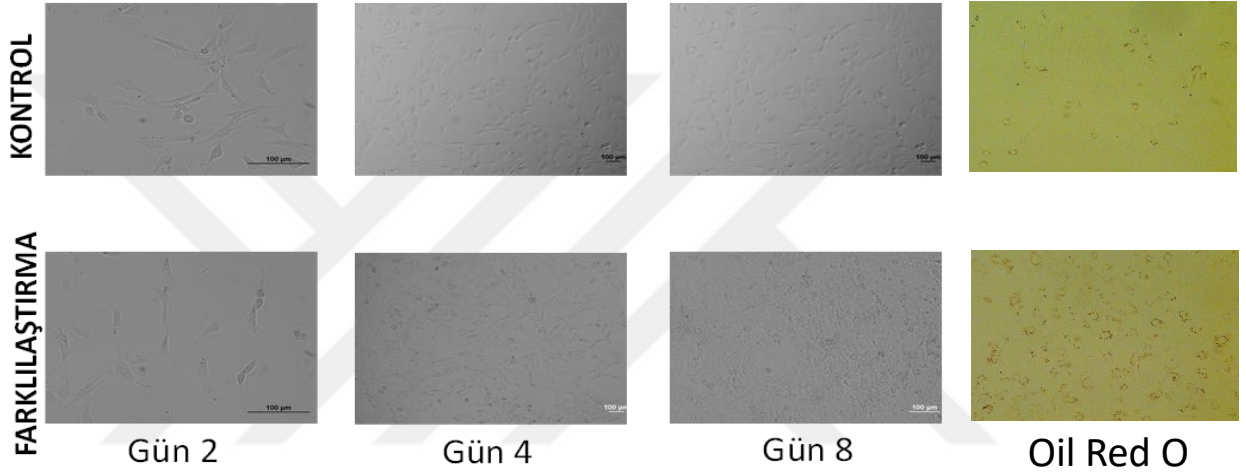
4.1 3T3-L1 Pre-Adipositlerinin Adipositlere Farklılaştırılması

Mus musculus embriyosundan izole edilen fibroblast özellikteki 3T3-L1 hücreleri DEX, IBMX ve insülin içeren ortamda 3.2.5'te belirtilen farklılaşma protokolüne uygun olarak büyütülmesi sonucunda adiposit hücrelerine farklılaştırılmıştır. Lipid damlacıkları ışık mikroskopunda incelenmiştir. Farklılaşma süreci boyunca ışık mikroskopunda alınan görüntülerde oluşan lipid damlacıkları açıkça gözükmemektedir. Fibroblastların uzun iğ şeklindeki morfolojisi yuvarlak bir şekil almıştır (Şekil 4.1).



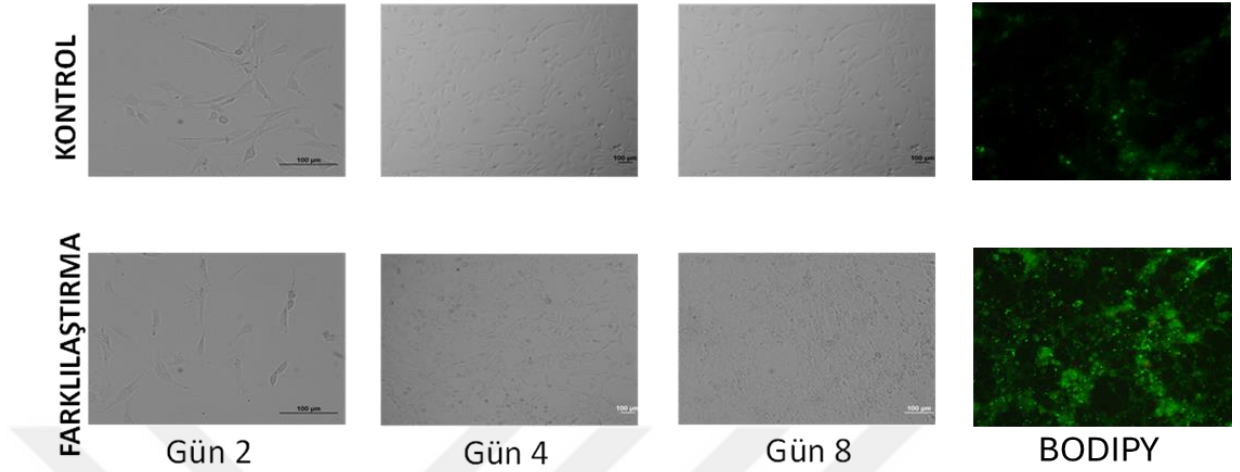
Şekil 4-1: 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma süreci boyunca ışık mikroskobu görüntüleri. Hücreler %70 yoğunlukta (Gün 2), pre-diferansiyasyon ortamında (Gün 4) ve diferansiyasyon ortamında (Gün 8) invert ışık mikroskopunda çekim alınmıştır.

3T3-L1 hücrelerinin adipositlere farklılaşma sürecini değerlendirme amacıyla farklı boyama teknikleri kullanılmıştır. 3T3-L1 hücrelerinin lipid profillerini histolojik açıdan incelemek amacıyla Oil Red O boyaması gerçekleştirilmiştir. Oil Red O boyamada lipid damlacıkları kırmızı renkte görülmektedir. Farklılaşan hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla kırmızı boyanan lipid damlacıklarının sayısı belirgin bir şekilde artmıştır (Şekil 4.2).



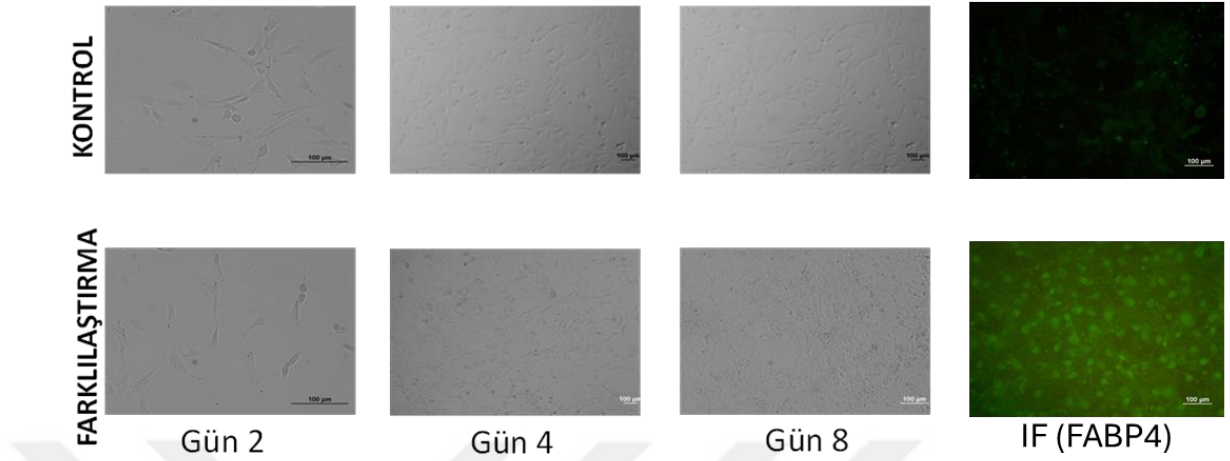
Şekil 4-2: 3T3-L1 hücrelerinin Oil Red O boyama görüntüleri. Farklılaştırılan hücelere Oil Red O boyama protokolü uygulanarak invert ışık mikroskobunda görüntü alınmıştır.

3T3-L1 hücrelerinin farklılaşması sonucu oluşan lipid damlacıklarını daha yüksek çözünürlüklü ve floresan temelli görüntülemek amacıyla BODIPY boyama gerçekleştirilmiştir. BODIPY boyama ile farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde belirgin bir şekilde artmış lipid birikimine bağlı olarak yoğun yeşil floresan sinyaller gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda ise yeşil sinyallerin belirgin bir şekilde düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).



Ŗekil 4-3: 3T3-L1 hücrelerinin BODIPY boyama görüntüleri. Farklılaştırılan hücrelere BODIPY boyama protokolü uygulanarak floresan mikroskopunda görüntü alınmıştır.

Adipogenez sürecinde spesifik role sahip biyobelirteçlerden biri olan FABP4'ü hedeflemek için immünofloresan boyama gerçekleştirilmiştir. Farklılaşan hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla FABP4 antikorunun ışına miktarının artması gözlemlenmektedir. Farklılaşma biyobelirteci olarak görev yapan FABP4'ün ışına miktarının artması farklılaştırmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (Ŗekil 4.4). Üç farklı boyama yöntemi kullanılarak adiposit farklılaştırılmasının morfolojik ve moleküler düzeyde incelenmesi sağlanmıştır.

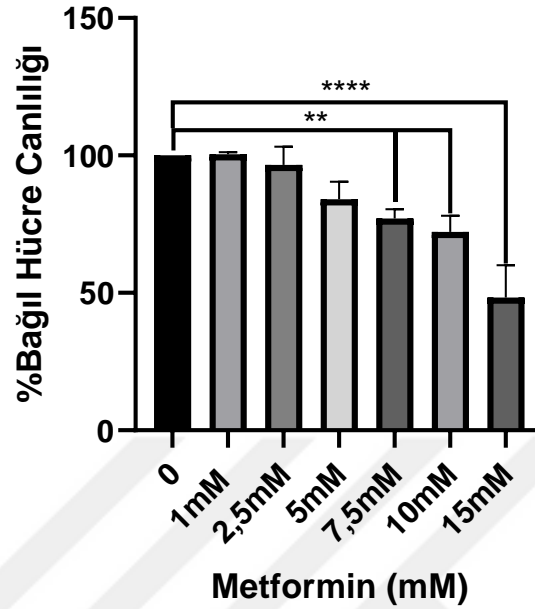


Şekil 4-4: 3T3-L1 hücrelerinin immünofloresan boyama görüntüleri. Farklılaştırılan hücelere FABP4 işaretli immünofloresan boyama protokolü uygulanarak floresan mikroskopunda görüntü alınmıştır.

4.2 Metformin Uygulanmasının 3T3-L1 Hücrelerinde Hücre Canlılığına Etkisinin İncelenmesi

Antidiyabetik metforminin farklılaşma sürecine etkisini araştırmak amacıyla 3T3-L1 hücrelerine artan dozlarda metformin uygulanarak farklılaştırma sürecinde metforminin hücre canlılığına etkisi MTT deneyi ile incelenmiştir. Metformin farklılaşma sürecinde Pre-diferansiyasyon ve Diferansiyasyon ortamlarına eklenmiştir.

Yapılan MTT deneyleri sonucunda, 1 mM Metformin uygulaması hücre canlılığında kontrol hücrelerine oranla %0, 2,5 mM Metformin uygulaması %4, 5 mM Metformin uygulaması %16, 7,5 mM Metformin uygulaması %23, 10 mM Metformin uygulaması %28, 15 mM Metformin uygulaması %52 oranında hücre canlılığında azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.5Şekil 4-5).

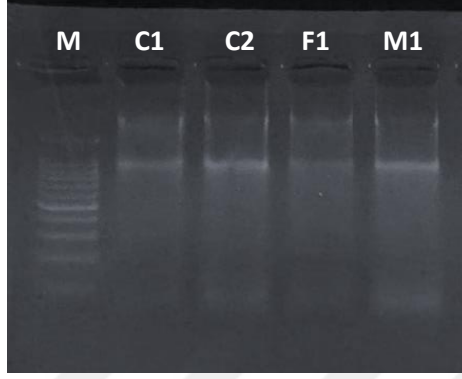


Şekil 4-5:Metforminin MTT yöntemi ile 3T3-L1 hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi. Hücelere farklılaşma süreci boyunca artan dozlarda (1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM, 15 mM) metformin ilacı uygulanmasıyla süreç sonunda MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. Yapılan deney grupları 4 tekrarlı 3 farklı deneyin ortalamasıdır. Sonuçlar GraphPad Prism 8.0.1 ile sütun grafiği oluşturulmuştur. (**p=0,0012, ****p<0,0001)

4.3 Sentezlenen cDNA Örneklerinin Spektral ve Elektroforetik Yöntemlerle Analiz Edilmesi

RNA kırılğan yapısı, otokatalitik etkisi ve düşük stabilitesi nedeniyle muhafazası zor bir moleküldür. Bu nedenle RNA daha dayanıklı bir moleküler olan DNA'ya çevrilmektedir. Reverse transkriptaz enzimi yardımıyla cDNA'ya çevrilen RNA örneklerinin konsantrasyonlarını ve yapılarını incelemek amacıyla spektral ve elektroforetik analizler gerçekleştirilmiştir. RNA ve cDNA örnekleri spektrofotometre cihazıyla ölçülerek, konsantrasyonları Tablo 4.1: cDNA Örneklerinin Spektrofotometre Sonuçları .1'de

belirtilmiştir. Konsantrasyonları belirlenen RNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde yürütülerek yapıları incelenmiştir. (Şekil 4.6).



Şekil 4-6: RNA Örneklerinin Elektroforetik Sonuçları. İzole edilen RNA örnekleri %1,5'lik agaroz jelde yürütülmüştür. 1 kb Marker kullanılmıştır.

Tablo 4.1: cDNA Örneklerinin Spektrofotometre Sonuçları

ÖRNEKLER	RNA Konsantrasyonları	cDNA Konsantrasyonları
Kontrol 1	1197 ng/μl	917 ng/μl
Kontrol 2	1292 ng/μl	1011 ng/μl
Farklılaştırma 1	613 ng/μl	1132 ng/μl
Metformin 1	1025 ng/μl	1036 ng/μl

4.4 Gradient PCR ile Primerlerin Optimum Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Laboratuvarda ilk defa kullanılacak olan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklarını tespit etmek amacıyla Gradient PCR gerçekleştirilmiştir. Aynı cDNA kalıbı kullanılarak aynı primerlerin farklı sıcaklıklardaki optimum bağlanma sıcaklıkları analiz edilmiştir. Gradient PCR sıcaklıkları için 50°C ile 65°C aralığı kullanılmıştır. Gradient PCR

gerçekleştirilen cDNA örnekleri %1,5'lik agaroz jelde yürütülerek Transilluminator (BioRad) cihazından görüntü alınmıştır. Örneklerin baz çifti uzunluklarını kontrol edebilmek amacıyla 100 bp Marker kullanılmıştır.



Şekil 4-7: β -actin Primerinin Gradient PCR Görüntüsü. 100 bp Marker, 174 bp PCR ürünü uzunluğu. Sırasıyla 65,0 °C, 63,8 °C, 62,0 °C, 59,1 °C, 55,7 °C, 52,9 °C, 51,0 °C, 50°C sıcaklıkları kullanılmıştır.



Şekil 4-8: FASN Primerinin Gradient PCR Görüntüsü. 100 bp Marker, 139 bp PCR ürünü uzunluğu. Sırasıyla 65,0 °C, 63,8 °C, 62,0 °C, 59,1 °C, 55,7 °C, 52,9 °C, 51,0 °C, 50°C sıcaklıkları kullanılmıştır.



Şekil 4-9: SREBP-1c Primerinin Gradient PCR Görüntüsü. 100 bp Marker, 153 bp PCR ürünü uzunluğu. Sırasıyla 65,0 °C, 63,8 °C, 62,0 °C, 59,1 °C, 55,7 °C, 52,9 °C, 51,0 °C, 50°C sıcaklıkları kullanılmıştır.



Şekil 4-10: PPAR- γ Primerinin Gradient PCR Görüntüsü. 100 bp Marker, 122 bp PCR ürünü uzunluğu. Sırasıyla 65,0 °C, 63,8 °C, 62,0 °C, 59,1 °C, 55,7 °C, 52,9 °C, 51,0 °C, 50°C sıcaklıkları kullanılmıştır.



Şekil 4-11: CEBP- α Primerinin Gradient PCR Görüntüsü. 100 bp Marker, 124 bp PCR ürünü uzunluğu. Sırasıyla 65,0 °C, 63,8 °C, 62,0 °C, 59,1 °C, 55,7 °C, 52,9 °C, 51,0 °C, 50°C sıcaklıkları kullanılmıştır.

Gradient PCR sonuçları incelendiğinde β -actin primerinde 55,7 °C ‘den itibaren non-spesifik bağlanma gözlemlenmiştir. β -actin primeri için 65,0 °C ile 59,1 °C aralığı optimum bağlanma sıcaklığıdır (Şekil 4.7). FASN ve CEBP- α primerlerinde 52,9 °C’den itibaren non-spesifik bağlanmalar gözlemlenmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.11). SREBP-1c ve PPAR- γ primerlerinde ise 62,0 °C’den itibaren non-spesifik bağlanmalar gözlemlenmiştir (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Bu nedenle tüm primerler için optimum bağlanma sıcaklığı 63,8 °C olarak belirlenmiş ve qRT-PCR deneyleri bu sıcaklık üzerinden gerçekleştirilmiştir.

4.5 3T3-L1 Hücrelerinde Metformin Uygulamasının Lipid Metabolizmasına Ait Protein Ekspresyonları Üzerine Etkisinin İncelenmesi

3T3-L1 pre-adiposit hücrelerine metformin uygulanmasının lipid metabolizmasında yer alan ve pre-adipositlerin adipositlere farklılaşması sürecinde aktif rol oynayan proteinlerin ekspresyonlarına etkisini incelemek amacıyla immünoablota yapılmıştır.

İmmünoablota kontrol grubu olarak farklılaştırılmamış 3T3-L1 pre-adipositleri kullanılmıştır. Farklılaşma grubu olarak pre-diferansiyasyon ve diferansiyasyon ortamında belirtilen kondisyonlarda farklılaştırılan hücreler kullanılmıştır. Metformin grubunda ise farklılaştırılan ve 10mM metformin uygulanan hücreler kullanılmıştır.

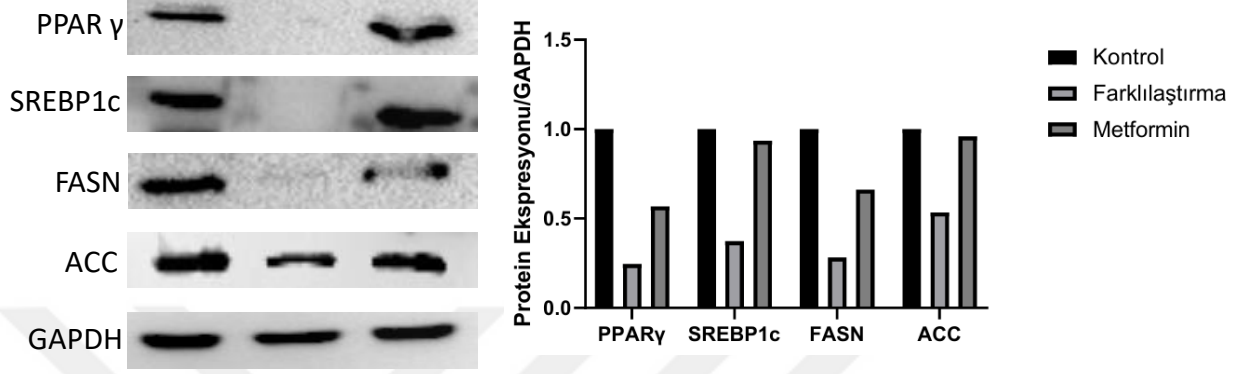
İmmünoablota sonuçları incelendiğinde PPAR γ ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla farklılaştırma grubunda azalış gösterirken, metformin uygulanan grup kontrol grubuna göre azalış, farklılaştırma grubuna göre artış göstermiştir.

SREBP1c ekspresyonu da benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla farklılaştırma grubunda azalış gösterirken, metformin uygulanan grup kontrol grubuna göre azalış, farklılaştırma grubuna göre artış göstermiştir.

ACC ve FASN ekspresyonları da benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla farklılaştırma grubunda azalış gösterirken, metformin uygulanan grup kontrol grubuna göre azalış, farklılaştırma grubuna göre artış göstermiştir.

Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Gerçekleştirilen immünoablota sonucunda elde edilen jel görüntülerindeki bant yoğunlukları Image J programı aracılığıyla analiz edilmiştir. Proteinlerin bant yoğunlukları yükleme kontrolü olarak

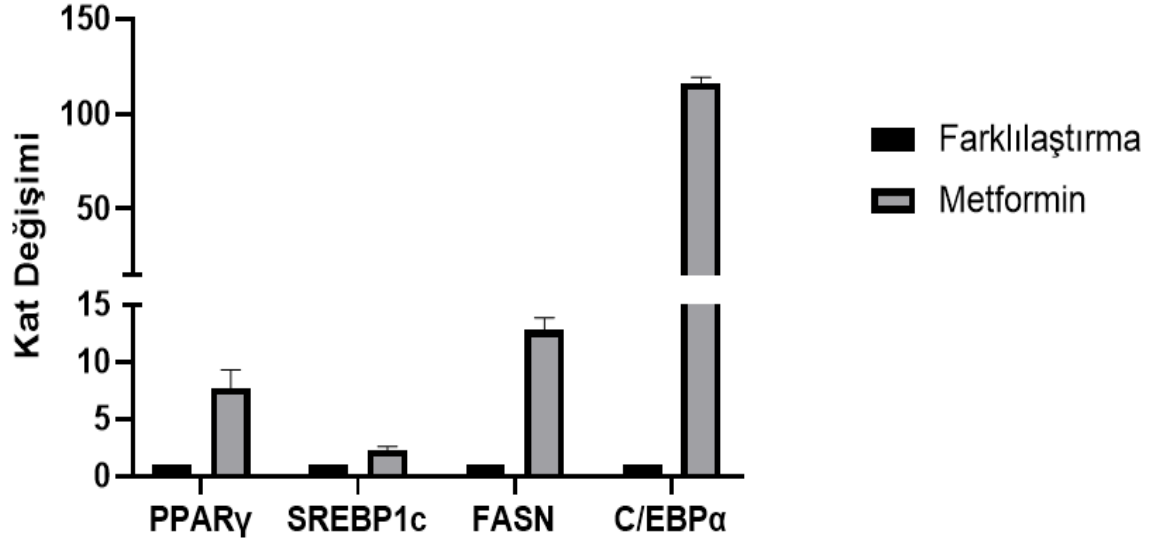
kullanılan GAPDH bantlarına göre normalize edilmiş ve ekspresyon seviyelerinin değişimleri hesaplanarak grafik oluşturulmuştur (Şekil 4.12).



Şekil 4-12: 3T3-L1 Hücrelerinde Metforminin Lipid Metabolizmasına Etkisinin İmmünoiblotlama Yöntemi ile İncelenmesi. Yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanıldı. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

4.6 3T3-L1 Hücrelerinde Metformin Uygulamasının Lipit Metabolizmasına Ait Genlerin Ekspresyonları Üzerine Etkisinin qRT-PCR ile Gösterilmesi

İmmünoiblotlama yönteminde elde edilen sonuçları doğrulamak amacıyla 3T3-L1 hücrelerinden RNA izole edilerek cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA dönüştürülen örnekler, PPAR γ , FASN, C/EBP α , SREBP1c ve β -Aktin primerleriyle birlikte qRT-PCR gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen reaksiyon sonrası elde edilen CT değerleri kullanılarak PPAR γ , FASN, C/EBP α ve SREBP1c örnekleri β -Aktin'e göre normalize edilmiştir. Gen ifadelerindeki değişiklikler PFAFFL yöntemiyle hesaplanmıştır.



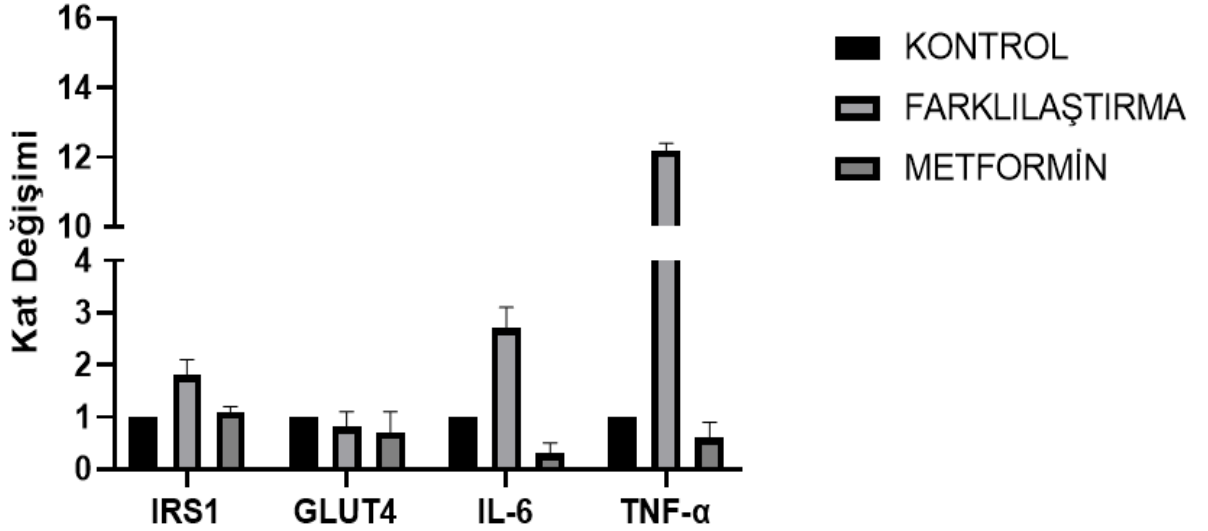
Şekil 4-13: 3T3-L1 Hücrelerinde Metforminin Lipid Metabolizmasına Etkisinin qRT-PCR Yöntemi ile İncelenmesi. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

3T3-L1 pre-adipositlerinin adipositlere farklılaştırılması ve metformin uygulanmasının lipid metabolizmasında görev alan bazı genlerin mRNA düzeylerine etkisini incelemek ve immünoiblotlama sonuçlarıyla karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirilen qRT-PCR analizinde metformin uygulamasının PPAR γ (~7,71 kat), SREBP1c (~2,2 kat), FASN (~12,76 kat) ve C/EBP α (~116 kat) gen ekspresyonlarında farklılaştırma grubuna oranla ciddi bir artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir.

Bu bulgular, metforminin farklılaştırılmış adiposit hücrelerinde adipogenez düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin gen ekspresyonlarını artırarak farklılaşma üzerinde bir etkisi olduğunu göstermektedir.

4.7 3T3-L1 Hücrelerinde Farklılaştırmanın İnsülin Direncine Ait Genlerin Ekspresyonları Üzerine Etkisinin qRT-PCR İle Gösterilmesi

3T3-L1 hücrelerinin farklılaştırılması ve metformin uygulaması sonucunda elde edilen immünoyblotlama ve qRT-PCR sonuçlarının literatürdeki çalışmaların sonuçlarıyla uyuşmaması nedeniyle hücrelerde çeşitli nedenlere bağlı olarak insülin direnci gelişip gelişmediğini analiz etmek amacıyla cDNA'ya dönüştürülen örnekler İnsülin Reseptör 1 (IRS1), Glukoz Taşıyıcısı Tip 4 (GLUT4), İnterlökin 6 (IL-6) ve Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α) ve β -Aktin primerleriyle birlikte qRT-PCR gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen reaksiyon sonrası elde edilen CT değerleri kullanılarak IRS1, GLUT4, IL-6 ve TNF- α örnekleri β -Aktin primerine göre normalize edilmiştir. Gen ifadelerindeki değişiklikler PFAFFL yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 4-14: 3T3-L1 Hücrelerinde Farklılaştırma ve Metformin Uygulamasının İnsülin Direncine Etkisinin qRT-PCR Yöntemi ile İncelenmesi. GraphPad Prism ile sütun grafiği oluşturuldu.

3T3-L1 pre-adipositlerinin adipositlere farklılaştırılması ve metformin uygulanmasının insülin direncinde görev alan bazı genlerin mRNA düzeylerine etkisini incelemek ve immüno blotlama sonuçlarıyla karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirilen qRT-PCR analizinde farklılaştırma grubunda IRS1 (~ 1,8 kat), IL-6 (~ 2,7 kat) ve TNF- α (~12,2 kat) gen ekspresyonlarında artış, GLUT4 (~ 0,8 kat) ise gen ekspresyonlarında azalış gözlemlenmiştir.

Metformin uygulaması sonucunda ise IRS1 (~ 1,1 kat) gen ekspresyonlarında artış, GLUT4 (~ 0,7 kat), IL-6 (~ 0,3 kat) ve TNF- α (~ 0,6 kat) gen ekspresyonlarında azalış gözlemlenmiştir.

Elde edilen bu bulgular, adiposit farklılaşması sürecinde insülin sinyal yollarının gen ekspresyonlarının anlamlı düzeyde değiştiğini, metformin uygulamasının ise bu değişiklikleri büyük ölçüde baskılayarak insülin duyarlılığını artırıcı etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır. qRT-PCR analizlerinden elde edilen bu sonuçlar, immüno blotlama verileriyle birlikte değerlendirildiğinde, metforminin adipositlerde moleküler düzeyde yarattığı düzenleyici etkileri desteklemekte ve insülin direnci ile ilişkili mekanizmaların anlaşılmasına önemli katkılar sunmaktadır.

5 TARTIŞMA

Enerji alımının, enerji harcanmasından uzun süreli olarak fazla olması durumunda ortaya çıkan obezite modern toplumda gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur. DSÖ tarafından sağlığı olumsuz düzeyde etkileyecek şekilde aşırı yağ birikimi olarak tanımlanan obezite prevalansı hızla artmaktadır. Güncel bir çalışmada 2050 yılına kadar dünyadaki yetişkin nüfusun yaklaşık %60'ının, çocuk ve ergenlerin ise yaklaşık %31'inin aşırı kilolu veya obez olacağını belirtmektedir. Bu tahmin, 3,8 milyar yetişkin ve 746 milyon genç anlamına gelmektedir (GBD 2021 Adult BMI Collaborators, 2025).

Küresel düzeyde salgın haline dönüşen bu bozukluk yalnızca kilo artışıyla ilişkilendirilmemelidir. Obezite genetik, çevresel, hormonal ve davranışsal etkiler sonucunda ortaya çıkan multifaktöriyel bir durumdur. Aşırı yağ artışı ise insülin direnci, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, bazı kanser türleri ve non-alkolik yağlı karaciğer gibi kronik hastalıkların temelini oluşturmaktadır. Obezitenin kompleks yapıdaki fizyolojik etkilerinin yanı sıra hücrel ve moleküler düzeydeki etkileri de oldukça karmaşıktır (Malik & Hu, 2022).

Moleküler düzeyde incelendiğinde obeziteyle birlikte adipoz dokuda meydana gelen genişleme, hücre sayısında (hiperplazi) ve hücre hacminde (hipertrofi) artış gözlemlenmektedir. Adipoz doku enerji depolamanın yanı sıra endokrin organ olarak da görev almaktadır. Bu nedenle adipoz dokunun endokrin görevi metabolik dengenin sağlanmasında kritik öneme sahiptir. Adipoz dokunun oluşmasında kritik bir role sahip adipogenez süreci, pre-adiposit hücrelerin adiposit hücrelere farklılaşması olarak da adlandırılmaktadır. Farklılaşma süreci çeşitli transkripsiyon faktörleriyle kontrol altında tutulan kompleks bir süreçtir. Farklılaşma sürecinin daha iyi anlaşılabilmesi hücre kültürü modelleri aracılığıyla sağlanmaktadır. 3T3-L1 pre-adiposit hücreleri farklılaşma yeteneklerinden dolayı obezite çalışmalarında ve farklılaşma sürecinin incelendiği

çalışmalarda sıklıkla tercih edilen hücre kültürü modellerinden biridir (Molani-Gol & Rafrat, 2024).

Metformin, tip 2 diyabet tedavisinde anti-diyabetik etkinliği sebebiyle sıklıkla tercih edilen ve insülin direncini azaltıcı etkilere sahip bir biguanid türevidir (Herman et al., 2022a). Metforminin hücresele düzeyde etkisi AMPK üzerinden gerçekteşmektedir. AMPK aktivasyonu ile yağ oksidasyonunu ve glukoz alımını arttırmakta, lipogenez ve glukoneogenez yollarını ise baskılamaktadır. Bu durum metforminin lipit metabolizmasının düzenleyici transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonu aracılığıyla gerçekteşmektedir (Goel et al., 2022). Mevcut çalışmada obezitenin beraberinde getirdiği tip 2 diyabetin tedavisinde sıklıkla kullanılan terapötik ajanın lipit metabolizması üzerindeki etkilerini daha detaylı incelemek amacıyla metformin seğıilmiştir.

Mevcut çalışmada, öncelikli olarak 3T3-L1 pre-adiposit hücrelerinin olgun adipositlere farklılaştırılmasının optimizasyonu gerçekteştirilmiştir. Farklılaşma sürecinde değişkenlik gösteren pek çok parametre bulunmaktadır. Hücrelerin yoğunluğu, hücrelerin kültür süreleri, hücrelerin pasaj sayıları, farklılaştırma indükleyici ajanların konsantrasyonları, bu ajanların uygulanma zamanı ve besiyerinin içerisindeki serum tipi farklılaşmayı direkt olarak etkileyen önemli parametrelerdendir (Kraus et al., 2016) .

Literatürde 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasıyla ilgili olarak çok çeşitli görüş bulunmaktadır. Literatürdeki farklılaştırma protokolleri incelendiğinde mevcut protokollere benzer olarak uygulanan farklılaştırma protokolü materyal metod bölümünde belirtilen şekliyle uygulanmıştır (D. Chen et al., 2018b; Kraus et al., 2016; Poulos et al., 2010; Zebisch et al., 2012). Ancak yapılan bazı çalışmalar ATCC'de belirtilen farklılaşma protokolündeki farklılaşmayı indükleyici ajanların konsantrasyonlarında maksimum farklılaşma verimi alamadıklarını belirtmektedirler. Farklılaşmayı indükleyici ajanların konsantrasyonları da farklılaşma sürecinin başlaması ve doğru indüklenebilmesi için son derece önemlidir. Çil ve arkadaşlarının 2024 yılında yaptıkları güncel bir çalışma ile 3T3-L1 hücrelerinin adipositlere farklılaşmasında farklılaşma ajanlarının optimum konsantrasyonları olarak ATCC'de önerilen 0,5 mM IBMX, 1µM DEX ve 1µg/mL insülin miktarlarından verimli bir sonuç alamadıklarını belirtmişlerdir. Ayrıca yine aynı

çalışmada artan pasaj sayısı ile farklılaşma yeteneğinin zıt yönlü olarak değiştiğini bildirmişlerdir (Çil & Soysal, 2024).

Çeşitli araştırmalarda farklılaştırmanın başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için hücre yoğunluğunun %80-100 arasında olması gerektiği, farklılaşma ajanlarının hazırlandığı besiyeri serumunun FBS ile hazırlanması gerektiği, FBS'in 3T3-L1 pre-adiposit hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği belirtilmektedir (Katz et al., 2014).

Mevcut çalışmada 3T3-L1 hücrelerinin farklılaştırılması için herhangi bir pozitif kontrol kullanılmamıştır ancak bazı çalışmalarda anti-diyabetik etkileri olan Rosiglitazone kullanılmaktadır (Flori et al., 2025). Rosiglitazone güçlü bir PPAR γ agonisti olarak görev yapmaktadır ve 3T3-L1 pre-adipositlerinin olgun adipositlere farklılaşmasını anlamlı düzeyde arttırmaktadır. Rosiglitazone, PPAR γ aktivasyonu sağlayarak FASN, ACC, FABP4 gibi lipid metabolizmasında görev alan genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Farklılaşma sürecine Rosiglitazone eklenmesi lipid birikimini ve insülin duyarlılığını arttırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle Rosiglitazone, çalışmalarda sıklıkla farklılaştırmanın pozitif kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır (García-García & Jaramillo-Flores, 2024, Jiang et al., 2024).

Mevcut çalışmada kullanılan farklılaşma protokolü sonrasında, farklılaşmanın doğru bir şekilde gerçekleştiğini göstermek amacıyla Oil Red O boyama, BODIPY boyama ve İmmünofloresan boyama gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar bölümünde bahsedildiği gibi kontrol grubuna kıyasla farklılaştırma grubunda Oil Red O, BODIPY ve immünofloresan boyama sonuçlarında ciddi farklılıklar bulunmaktadır. Bu durum uygulanan farklılaşma protokolünün doğru bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Bu konuda yapılan çalışmalara bakıldığında sonuçlarımıza benzer şekilde boyama sonuçlarında farklılaşma grubunda belirgin bir fark görülmektedir (Flori et al., 2025; Katz et al., 2014; Pandurangan et al., 2016; Xu et al., 2017).

Uygulanan farklı boyama teknikleri sonucunda 3T3-L1 hücrelerinin morfolojik olarak değiştiği ve hücrelerde lipid birikimi doğrulanmış olsa da PPAR γ , SREBP1c, FASN gibi adipogenez süreciyle ilişkili genlerin ifadelerinde bir artış gözlemlenmemesi farklılaşmanın sadece fenotipik olarak başarılı olduğu, moleküler düzeyde tam olarak

aktive edilemediği düşüncesini yaratmaktadır. Ancak kontrol grubunda bu genlerin ifadelerinin olması, farklılaştırma grubunda olmaması moleküler düzeyde farklılaştırılmanın aktive edilmesinden ziyade baskılandığını göstermektedir. Bu karmaşık durumu daha net değerlendirebilmek için immünoyotlama ve qRT-PCR ile protein ve mRNA seviyesinde incelemeler yapılmıştır.

Bu çalışmada, 3T3-L1 pre-adiposit hücrelerinde uygulanan metformin tedavisinin, adipogenez sürecine ve lipid metabolizmasına ilişkin başlıca transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Deneysel gruplar arasında yapılan karşılaştırmalar sonucunda, kontrol grubunda PPAR γ , C/EBP α , SREBP-1c, FASN ve ACC gibi adipogenezle ilişkili genlerin belirgin şekilde ifade edildiği, farklılaşma grubunda bu ekspresyonların azaldığı, metformin uygulanan farklılaşma grubunda ise ekspresyon seviyelerinin yeniden arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, literatürde adipogenez sürecinde beklenenin aksine bazı transkripsiyon faktörlerinin erken evrede baskılanabileceğini ortaya koyan çalışmaları desteklemektedir. Özellikle preadipositlerin diferansiyasyonunun erken dönemlerinde (0-4 gün), PPAR γ ve C/EBP α gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunun baskılanabileceği ya da geç aktive olabileceği rapor edilmiştir (Lee et al., 2020; Hammarstedt et al., 2018). Ayrıca bazı çalışmalarda, farklılaşma sırasında oluşan oksidatif stres, ER stresi ya da diğer hücre içi stres faktörlerinin transkripsiyonel yanıtları baskılayarak lipid metabolizmasını geçici olarak inhibe edebileceği bildirilmiştir (Gregor & Hotamisligil, 2011). Bu bağlamda, farklılaşma protokolüyle elde edilen adiposit benzeri hücrelerin morfolojik olarak olgunlaşmış olması, bu durumun her zaman ilgili gen ekspresyonlarının da yüksek olacağı anlamına gelmemektedir.

Metformin uygulamasının gen ekspresyonunu yeniden artırması ise hücresel metabolik dengeyi iyileştirmesi ve insülin duyarlılığını artırması ile ilişkilendirilebilmektedir. AMPK aktivasyonu, SREBP-1c ve FASN gibi lipogenik faktörlerin baskılanmasına neden olurken aynı zamanda insülin sinyali üzerinden PPAR γ gibi adipogenik transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırabilmektedir. Nitekim, metformin tedavisiyle birlikte artan PPAR γ ekspresyonu, hücrelerin insülin duyarlılığında iyileşme olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgu, insülin duyarlılığının arttığı durumlarda PPAR γ

ekspresyonunun da artabileceğini öne süren çalışmalara paralel sonuçlar ortaya koymaktadır (Ahmadian et al., 2013). Ayrıca, metformin'in düşük dozlarda adipogenez destekleyebildiği, yüksek dozlarda ise bu süreci baskılayabildiği gösterilmiş olup (Zhou et al., 2018), bu çalışmada kullanılan dozun farklılaşmayı teşvik edici yönde etkili olduğu düşünülmektedir.

Obezite oluşumunda yağ hücrelerinde anormal lipid depolanması, insülin direnci ve artmış inflamasyon sıklıkla görülen durumlardandır. Roh ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada obezite sırasında PPAR γ aktivitesinde azalma gözlemlenmiştir. Bu durumun yağ hücrelerinin farklılaşması sırasında insülin sinyallenmesinin baskılanması ve metabolik bozukluklar sonucu ortaya çıktığını öne sürmektedirler (Roh et al., 2020).

Normal olarak farklılaştırılmış 3T3-L1 yağ hücreleri insüline karşı oldukça duyarlıdır. Ancak, obezite durumuyla ilişkili çok sayıda faktör, TNF- α , IL-6, deksametazon konsantrasyonu, yüksek insülin uygulaması ve hipoksik ortama maruz kalma dahil olmak üzere farklılaşmış 3T3-L1 yağ hücrelerinde insülin direncini indüklenme kapasitesine sahiptirler (Odeniyi et al., 2024). Bu konuda gerçekleştirilen başka çalışmalarda yüksek glikoz ve insülin maruziyeti sonucu 3T3-L1 hücrelerinde indüklenen insülin direnci PI3K/Akt sinyal yolunu inhibe ettiğini ve GLUT4 translokasyonunu azalttığını göstermektedirler (Huang et al., 2018; Yudhani et al., 2023).

Literatürde, adipogenez sürecinde kronik olarak aktive olan inflamatuvar yanıtın insülin sinyal iletimini olumsuz etkilemesi sonucu IRS1 fosforilasyonun bozulduğu ve GLUT4'ün hücre zarına taşınmasının engellendiği çalışmalar bulunmaktadır (Langlais et al., 2011; van Gerwen et al., 2023). Bu bağlamda mevcut çalışmada elde edilen sonuçlarda IRS1 ve GLUT4 ekspresyonundaki azalma, hücrelerin insüline yanıt verme kapasitesinde bir düşüş olduğu ve insülin direnci gelişiminin desteklendiği sonucuna varılmaktadır. Aynı zamanda, TNF- α ve IL-6 düzeylerindeki artış da inflamasyona bağlı insülin direnci mekanizmalarıyla uyumludur.

Metforminin, başta AMPK yolu olmak üzere çeşitli sinyal iletim yollarını aktive ederek glukoz dengesini düzenlediği bilinmektedir. AMPK aktivasyonu, GLUT4'ün membrana translokasyonunu artırmakta, böylece glukoz alımı kolaylaştırılmaktadır. Aynı zamanda AMPK, lipogenez ve inflamasyonu baskılayan gen ekspresyonlarını indükleyerek TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin düzeyini azaltır (Naghiaee et al., 2020; K. F. Petersen & Shulman, 2006). Metforminin anti-inflamatuar etkileri de dikkate değerdir. Özellikle adiposit kaynaklı inflamatuvar yanıtın baskılanması, metforminin obezite ve tip 2 diyabetle ilişkili kronik düşük dereceli inflamasyon üzerinde olumlu etkiler gösterebildiğini ortaya koymaktadır (de Luca & Olefsky, 2008; Herman et al., 2022b). Çalışmamızda da gözlemlenen IL-6 ve TNF- α düzeylerindeki düşüş, bu mekanizmayla uyumludur.

Sonuç olarak, bu tez çalışması metforminin 3T3-L1 adipositlerinde lipid metabolizmasına yönelik belirgin düzenleyici etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır. Metformin uygulaması, lipid metabolizmasında önemli görevleri bulunan çeşitli genlerin ekspresyon seviyelerini dengeleyerek, adipositlerin adipogenez, lipogenez ve lipoliz süreçlerindeki dengesizliğini düzenleyerek, hücrel lipid homeostazının yeniden sağlanmasına katkıda bulunmuştur. Ayrıca, metforminin bu etkileri yalnızca glukoz metabolizması üzerindeki klasik düzenleyici rolüyle sınırlı kalmamış; inflamatuvar yanıtları baskılaması ve adipogenez sürecini modüle etmesi yoluyla lipid metabolizması üzerinde de kapsamlı bir kontrol sağladığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, metforminin adipositlerde biriken lipidlerin regülasyonu ve yağ dokusunun fonksiyonel bütünlüğünün korunması açısından önemli bir rolü olabileceğini göstermekte; özellikle obezite ve buna bağlı gelişen metabolik bozuklukların hücrel temellerine yönelik literatüre katkı sunmaktadır.

Gelecek çalışmalarda, metforminin lipid metabolizması üzerindeki etkileri daha detaylı olarak araştırılmalı; özellikle lipogenez, lipoliz ve enerji metabolizmasında görevli moleküler hedefleri netleştirilmelidir. Ayrıca, farklı uygulama zamanları ve dozlarının adipogenez sürecine olan etkileri değerlendirilerek, metforminin hücrel farklılaştırılmada optimum yönlendirici rolü daha iyi ortaya konulabilmektedir. Bu bulguların in vivo modellerle desteklenmesi, metforminin obezite ve metabolik hastalıklardaki klinik potansiyelini daha güçlü biçimde ortaya koyacaktır.

KAYNAKÇA

- Adamou, H., François, D., Lebel, A., & Paquette, M. C. (2024). Life-course socioeconomic status and obesity: a scoping review protocol. *BMJ Open*, *14*(2). <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2023-077750>
- Ahmadian, M., Wang, Y., & Sul, H. S. (2010). Lipolysis in adipocytes. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 42, pp. 555–559). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.12.009>
- Ambele, M. A., Dhanraj, P., Giles, R., & Pepper, M. S. (2020). Adipogenesis: A complex interplay of multiple molecular determinants and pathways. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21124283>
- Apostolova, N., Iannantuoni, F., Gruevska, A., Muntane, J., Rocha, M., & Victor, V. M. (2020). Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. In *Redox Biology* (Vol. 34). <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101517>
- Arslan, Y., Erdemir Işık, M., Paköz, B., & Arslan, I. B. (2024). The etiological relationship of obstructive sleep apnea-obesity and carotid atherosclerosis. *Turkish Journal of Cerebrovascular Diseases*, *30*, 87–93. <https://doi.org/10.5505/tbdhd.2024.37801>
- Artasensi, A., Mazzolari, A., Pedretti, A., Vistoli, G., & Fumagalli, L. (2023). Obesity and Type 2 Diabetes: Adiposopathy as a Triggering Factor and Therapeutic Options. In *Molecules* (Vol. 28). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules28073094>
- Bailey, C. J. (2017). Metformin: historical overview. *Diabetologia*, *60*(9), 1566–1576. <https://doi.org/10.1007/S00125-017-4318-Z/FIGURES/5>
- Begriche, K., Massart, J., Robin, M. A., Borgne-Sanchez, A., & Fromenty, B. (2011). Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. In *Journal of Hepatology* (Vol. 54, pp. 773–794). <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.006>
- Belladelli, F., Montorsi, F., & Martini, A. (2022). Metabolic syndrome, obesity and cancer risk. In *Current Opinion in Urology* (Vol. 32, pp. 594–597). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000001041>

- BERBEROĞLU, Z., & HOCAOĞLU, C. (2021). Küresel Sağlık Sorunu ‘Obezite’: Güncel Bir Gözden Geçirme. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(3). <https://doi.org/10.34087/cbusbed.886473>
- Bian, X., Liu, R., Meng, Y., Xing, D., Xu, D., & Lu, Z. (2021). Lipid metabolism and cancer. In *Journal of Experimental Medicine* (Vol. 218, Issue 1). <https://doi.org/10.1084/JEM.20201606>
- Blüher, M. (2019). Obesity: global epidemiology and pathogenesis. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 15, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>
- Borrell, L. N., & Talih, M. (2012). Examining periodontal disease disparities among U.S. adults 20 years of age and older: NHANES III (1988-1994) and NHANES 1999-2004. *Public Health Reports*, 127(5). <https://doi.org/10.1177/003335491212700505>
- Bremner, J. D., Moazzami, K., Wittbrodt, M. T., Nye, J. A., Lima, B. B., Gillespie, C. F., Rapaport, M. H., Pearce, B. D., Shah, A. J., & Vaccarino, V. (2020). Diet, stress and mental health. In *Nutrients* (Vol. 12, pp. 1–27). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12082428>
- Chandrasekaran, P., & Weiskirchen, R. (2024). The Role of Obesity in Type 2 Diabetes Mellitus—An Overview. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25031882>
- Chaney, A. (2021). Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In *Nursing Clinics of North America* (Vol. 56, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2021.07.009>
- Che, L., Paliogiannis, P., Cigliano, A., Pilo, M. G., Chen, X., & Calvisi, D. F. (2019). Pathogenetic, Prognostic, and Therapeutic Role of Fatty Acid Synthase in Human Hepatocellular Carcinoma. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01412>
- Chen, D., Wang, Y., Wu, K., & Wang, X. (2018a). Dual effects of metformin on adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocyte in AMPK-dependent and independent manners. *International Journal of Molecular Sciences*, 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19061547>
- Chen, D., Wang, Y., Wu, K., & Wang, X. (2018b). Dual effects of metformin on adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocyte in AMPK-dependent and independent manners. *International Journal of Molecular Sciences*, 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19061547>
- Chen, Q., Yang, X., Zhang, H., Kong, X., Yao, L., Cui, X., Zou, Y., Fang, F., Yang, J., & Chang, Y. (2017). Metformin impairs systemic bile acid homeostasis through regulating SIRT1 protein levels. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.020>

- Chen, R., & Armamento-Villareal, R. (2024). Obesity and Skeletal Fragility. In *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 109, pp. e466–e477). Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgad415>
- Chen, S. X., Zhang, L. J., & Gallo, R. L. (2019). Dermal White Adipose Tissue: A Newly Recognized Layer of Skin Innate Defense. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 139, pp. 1002–1009). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.12.031>
- Çil, E. N., & Soysal, Y. (2024). Obezite Araştırmaları İçin İn Vitro Adiposit Hücre Kültürü İle Etkili Model Oluşturma: Ön Çalışma. *Turkish Journal of Diabetes and Obesity*, 8, 59–64. <https://doi.org/10.25048/tudod.1418459>
- Concepción-Zavaleta, M. J., Quiroz-Aldave, J. E., Durand-Vásquez, M. del C., Gamarra-Osorio, E. R., Valencia de la Cruz, J. del C., Barrueto-Callirgos, C. M., Puelles-León, S. L., Alvarado-León, E. de J., Leiva-Cabrera, F., Zavaleta-Gutiérrez, F. E., Concepción-Urteaga, L. A., & Paz-Ibarra, J. (2024). A comprehensive review of genetic causes of obesity. In *World Journal of Pediatrics* (Vol. 20, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s12519-023-00757-z>
- Dakanalis, A., Mentzelou, M., Papadopoulou, S. K., Papandreou, D., Spanoudaki, M., Vasios, G. K., Pavlidou, E., Mantzourou, M., & Giaginis, C. (2023). The Association of Emotional Eating with Overweight/Obesity, Depression, Anxiety/Stress, and Dietary Patterns: A Review of the Current Clinical Evidence. In *Nutrients* (Vol. 15). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu15051173>
- Das, S., Mukhuty, A., Mullen, G. P., & Rudolph, M. C. (2024). Adipocyte Mitochondria: Deciphering Energetic Functions across Fat Depots in Obesity and Type 2 Diabetes. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25126681>
- de Andrade Mesquita, L., Wayerbacher, L. F., Schwartzmann, G., & Gerchman, F. (2023). Obesity, diabetes, and cancer: epidemiology, pathophysiology, and potential interventions. In *Archives of Endocrinology and Metabolism* (Vol. 67). Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000647>
- de Luca, C., & Olefsky, J. M. (2008). Inflammation and insulin resistance. In *FEBS Letters* (Vol. 582, pp. 97–105). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.057>
- DEMİRAY, G., & YORULMAZ, F. (2023). Halk Sağlığı Bakışıyla Obezite Yönetimi. *Sağlık Bilimlerinde Değer*, 13(1). <https://doi.org/10.33631/sabd.1101432>
- Demirci, Ş., & Gün, C. (2017). Adipoz Doku ve Adipoz Dokudan Salınan Bazı Proteinler. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg.*, 5(2).

- Devaux, M., & Sassi, F. (2013). Social inequalities in obesity and overweight in 11 OECD countries. *European Journal of Public Health, 23*(3).
<https://doi.org/10.1093/eurpub/ckr058>
- Donini, L. M., Busetto, L., Bischoff, S. C., Cederholm, T., Ballesteros-Pomar, M. D., Batsis, J. A., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cruz-Jentoft, A. J., Dicker, D., Frara, S., Frühbeck, G., Genton, L., Gepner, Y., Giustina, A., Gonzalez, M. C., Han, H. S., Heymsfield, S. B., Higashiguchi, T., ... Barazzoni, R. (2022). Definition and Diagnostic Criteria for Sarcopenic Obesity: ESPEN and EASO Consensus Statement. *Obesity Facts, 15*, 321–335. <https://doi.org/10.1159/000521241>
- Dyall, S. C., Balas, L., Bazan, N. G., Brenna, J. T., Chiang, N., da Costa Souza, F., Dalli, J., Durand, T., Galano, J. M., Lein, P. J., Serhan, C. N., & Taha, A. Y. (2022). Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 86). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2022.101165>
- Fang, B., Zheng, C., Ma, Y., Wu, F., Cheng, L., Li, Y., Wang, R., & Ren, F. (2024). Inhibited adipogenesis and low-grade inflammation enhance adipocyte hypertrophy in aging adipose tissue. *Food, Nutrition and Health, 1*, 2.
<https://doi.org/10.1007/s44403-024-00006-9>
- Farahani, A., Farahani, A., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2025). Inhibition of hepatic gluconeogenesis in type 2 diabetes by metformin: complementary role of nitric oxide. *Medical Gas Research, 15*, 507–519.
<https://doi.org/10.4103/mgr.MEDGASRES-D-24-00100>
- Flori, L., Galgani, G., Bray, G., Ippolito, C., Segnani, C., Pellegrini, C., Citi, V., Bernardini, N., Martelli, A., & Calderone, V. (2025). Development of an adipocyte differentiation protocol using 3T3-L1 cells for the investigation of the browning process: identification of the PPAR- γ agonist rosiglitazone as a browning reference drug. *Frontiers in Pharmacology, 16*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1546456>
- Frankl, J., Sherwood, A., Clegg, D. J., Scherer, P. E., & Öz, O. K. (2019). Imaging metabolically active fat: A literature review and mechanistic insights. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijms20215509>
- Friedenreich, C. M., Ryder-Burbidge, C., & McNeil, J. (2021). Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. In *Molecular Oncology* (Vol. 15, pp. 790–800). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12772>
- Gallus, S., Lugo, A., Murisic, B., Bosetti, C., Boffetta, P., & La Vecchia, C. (2015). Overweight and obesity in 16 European countries. *European Journal of Nutrition, 54*(5). <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0746-4>

- García-García, R. M., & Jaramillo-Flores, M. E. (2024). Effect of *Arthrospira maxima* Phycobiliproteins, Rosiglitazone, and 17 β -Estradiol on Lipogenic and Inflammatory Gene Expression during 3T3-L1 Preadipocyte Cell Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 25. <https://doi.org/10.3390/ijms25147566>
- GBD 2021 Adult BMI Collaborators. (2025). Global, regional, and national prevalence of adult overweight and obesity, 1990-2021, with forecasts to 2050: a forecasting study for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet (London, England)*, 405, 813–838. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(25\)00355-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(25)00355-1)
- Goel, S., Singh, R., Singh, V., Singh, H., Kumari, P., Chopra, H., Sharma, R., Nepovimova, E., Valis, M., Kuca, K., & Emran, T. Bin. (2022). Metformin: Activation of 5' AMP-activated protein kinase and its emerging potential beyond anti-hyperglycemic action. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1022739>
- González-Casanova, J. E., Navarro-Marquez, M., Saez-Tamayo, T., Angarita, L., Durán-Agüero, S., Fuentes-Barría, H., Bermúdez, V., & Rojas-Gómez, D. M. (2025a). New Perspectives on the Molecular Action of Metformin in the Context of Cellular Transduction and Adipogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 26. <https://doi.org/10.3390/ijms26083690>
- González-Casanova, J. E., Navarro-Marquez, M., Saez-Tamayo, T., Angarita, L., Durán-Agüero, S., Fuentes-Barría, H., Bermúdez, V., & Rojas-Gómez, D. M. (2025b). New Perspectives on the Molecular Action of Metformin in the Context of Cellular Transduction and Adipogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 26. <https://doi.org/10.3390/ijms26083690>
- Gürdöl, F. (2018). Fazla Yağlı Beslenme ve Mitokondri Disfonksiyonu. *Tıp Fakültesi Klinikleri*, 2018(212).
- Guru, A., Issac, P. K., Velayutham, M., Saraswathi, N. T., Arshad, A., & Arockiaraj, J. (2021). Molecular mechanism of down-regulating adipogenic transcription factors in 3T3-L1 adipocyte cells by bioactive anti-adipogenic compounds. In *Molecular Biology Reports* (Vol. 48, pp. 743–761). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06036-8>
- He, L. (2020). Metformin and Systemic Metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences*, 41(11), 868. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2020.09.001>
- Herman, R., Kravos, N. A., Jensterle, M., Janež, A., & Dolžan, V. (2022a). Metformin and Insulin Resistance: A Review of the Underlying Mechanisms behind Changes in GLUT4-Mediated Glucose Transport. *International Journal of Molecular Sciences*, 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23031264>

- Herman, R., Kravos, N. A., Jensterle, M., Janež, A., & Dolžan, V. (2022b). Metformin and Insulin Resistance: A Review of the Underlying Mechanisms behind Changes in GLUT4-Mediated Glucose Transport. *International Journal of Molecular Sciences*, 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23031264>
- Huang, X., Liu, G., Guo, J., & Su, Z. Q. (2018). The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. In *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 14, pp. 1483–1496). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.27173>
- Jiang, Y., Wang, W., Wang, H., Zhang, X., Kong, Y., Chen, Y. Q., & Zhu, S. (2024). ACSL1 positively regulates adipogenic differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 735. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150865>
- Kajbaf, F., De Broe, M. E., & Lalau, J. D. (2016). Therapeutic Concentrations of Metformin: A Systematic Review. In *Clinical Pharmacokinetics* (Vol. 55, Issue 4, pp. 439–459). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0323-x>
- Karra, P., Winn, M., Pauleck, S., Bulsiewicz-Jacobsen, A., Peterson, L., Coletta, A., Doherty, J., Ulrich, C. M., Summers, S. A., Gunter, M., Hardikar, S., & Playdon, M. C. (2022). Metabolic dysfunction and obesity-related cancer: Beyond obesity and metabolic syndrome. In *Obesity* (Vol. 30, pp. 1323–1334). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/oby.23444>
- Katz, L. S., Geras-Raaka, E., & Gershengorn, M. C. (2014). Heritability of fat accumulation in white adipocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 307. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00075.2014>
- Kazemi, N., Ramazani, E., & Tayarani-Najaran, Z. (2025). In vitro effects of phytochemicals on adipogenesis with a focus on molecular mechanisms: A systematic review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 28, 409–425. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2025.78924.17090>
- Kerns, J., & Fisher, M. (2020). Epidemiology, pathophysiology and etiology of obesity in children and adolescents. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2020.100869>
- Kim, H. Y., Jang, H. J., Muthamil, S., Shin, U. C., Lyu, J. H., Kim, S. W., Go, Y., Park, S. H., Lee, H. G., & Park, J. H. (2024). Novel insights into regulators and functional modulators of adipogenesis. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 177). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117073>
- Kim, H.-L., Chung, J., Kim, K.-J., Kim, H.-J., Seo, W.-W., Jeon, K.-H., Cho, I., Park, J. J., Lee, M.-H., Suh, J., Lim, S.-Y., Choi, S., & Kim, S.-H. (2022). Lifestyle Modification in the Management of Metabolic Syndrome: Statement From Korean

- Society of CardioMetabolic Syndrome (KSCMS). *Korean Circulation Journal*, 52, 93–109. <https://doi.org/10.4070/kcj.2021.0328>
- KİSMİROĞLU, C., CENGİZ, S., & YAMAN, M. (2020). AMPK'nin Biyokimyası: Etki Mekanizmaları ve Diyabetin Tedavisindeki Önemi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 18, 162–170. <https://doi.org/10.31590/EJOSAT.676335>
- Koundouros, N., & Pouligiannis, G. (2020). Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. In *British Journal of Cancer* (Vol. 122, pp. 4–22). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0650-z>
- Kraus, N. A., Ehebauer, F., Zapp, B., Rudolphi, B., Kraus, B. J., & Kraus, D. (2016). Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. *Adipocyte*, 5, 351–358. <https://doi.org/10.1080/21623945.2016.1240137>
- Lamoia, T. E., & Shulman, G. I. (2021). Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. In *Endocrine Reviews* (Vol. 42, Issue 1). <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa023>
- Langlais, P., Yi, Z., Finlayson, J., Luo, M., Mapes, R., De Filippis, E., Meyer, C., Plummer, E., Tongchinsub, P., Mattern, M., & Mandarino, L. J. (2011). Global IRS-1 phosphorylation analysis in insulin resistance. *Diabetologia*, 54, 2878–2889. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2271-9>
- Le, J., Chen, Y., Yang, W., Chen, L., & Ye, J. (2024). Metabolic basis of solute carrier transporters in treatment of type 2 diabetes mellitus. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.09.004>
- Lefterova, M. I., & Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 20, pp. 107–114). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.11.005>
- Liao, J., Xie, X., Wang, N., Wang, Y., Zhao, J., Chen, F., Qu, F., Wen, W., Miao, J., & Cui, H. (2024). Formononetin promotes fatty acid β -oxidation to treat non-alcoholic steatohepatitis through SIRT1/PGC-1 α /PPAR α pathway. *Phytomedicine*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155285>
- Liebisch, G., Fahy, E., Aoki, J., Dennis, E. A., Durand, T., Ejsing, C. S., Fedorova, M., Feussner, I., Griffiths, W. J., Köfeler, H., Merrill, A. H., Murphy, R. C., O'Donnell, V. B., Oskolkova, O., Subramaniam, S., Wakelam, M. J. O., & Spener, F. (2020). Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *Journal of Lipid Research*, 61, 1539–1555. <https://doi.org/10.1194/jlr.S120001025>
- Lingvay, I., Sumithran, P., Cohen, R. V., & le Roux, C. W. (2022). Obesity management as a primary treatment goal for type 2 diabetes: time to reframe the conversation. In *The Lancet* (Vol. 399, pp. 394–405). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01919-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01919-X)

- Madiraju, A. K., Erion, D. M., Rahimi, Y., Zhang, X. M., Braddock, D. T., Albright, R. A., Prigaro, B. J., Wood, J. L., Bhanot, S., MacDonald, M. J., Jurczak, M. J., Camporez, J. P., Lee, H. Y., Cline, G. W., Samuel, V. T., Kibbey, R. G., & Shulman, G. I. (2014). Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, *510*(7506). <https://doi.org/10.1038/nature13270>
- Malik, V. S., & Hu, F. B. (2022). The role of sugar-sweetened beverages in the global epidemics of obesity and chronic diseases. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 18, pp. 205–218). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00627-6>
- Mazza, E., Troiano, E., Ferro, Y., Lisso, F., Tosi, M., Turco, E., Pujia, R., & Montalcini, T. (2024). Obesity, Dietary Patterns, and Hormonal Balance Modulation: Gender-Specific Impacts. In *Nutrients* (Vol. 16, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/nu16111629>
- Molani-Gol, R., & Rafrat, M. (2024). The anti-obesity effects of resveratrol on the 3T3-L1 adipocytes A systematic review. In *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* (Vol. 94, Issues 3–4). <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000784>
- Mutlu, A. S., Duffy, J., & Wang, M. C. (2021). Lipid metabolism and lipid signals in aging and longevity. In *Developmental Cell* (Vol. 56, pp. 1394–1407). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.034>
- Naghiaee, Y., Didehdar, R., Pourrajab, F., Rahmanian, M., Heiranizadeh, N., Mohiti, A., & Mohiti-Ardakani, J. (2020). Metformin downregulates miR223 expression in insulin-resistant 3T3L1 cells and human diabetic adipose tissue. *Endocrine*, *70*, 498–508. <https://doi.org/10.1007/s12020-020-02459-2>
- Obezite*. (n.d.). <https://Hsgm.Saglik.Gov.Tr/Tr/Obezite>.
- Odeniyi, I. A., Ahmed, B., Anbiah, B., Hester, G., Abraham, P. T., Lipke, E. A., & Greene, M. W. (2024). An improved in vitro 3T3-L1 adipocyte model of inflammation and insulin resistance. *Adipocyte*, *13*. <https://doi.org/10.1080/21623945.2024.2414919>
- Ozrail, M., Alardawi, A., Reeder, N., & Mosby, T. (2022). Body Fat Distribution (Android vs. Gynoid) and Dietary Intake Among Young Women Enrolled at Mississippi State University. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, *122*(9). <https://doi.org/10.1016/j.jand.2022.06.050>
- Palacios-Marin, I., Serra, D., Jimenez-Chillarón, J., Herrero, L., & Todorčević, M. (2023). Adipose Tissue Dynamics: Cellular and Lipid Turnover in Health and Disease. In *Nutrients* (Vol. 15). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/nu15183968>

- Pandurangan, M., Jin, B. Y., & Kim, D. H. (2016). ZnO Nanoparticles Upregulates Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells. *Biological Trace Element Research*, 170, 201–207. <https://doi.org/10.1007/s12011-015-0464-7>
- Panov, A. V., Mayorov, V. I., & Dikalov, S. I. (2024). Role of Fatty Acids β -Oxidation in the Metabolic Interactions Between Organs. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms252312740>
- Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2006). Etiology of insulin resistance. *American Journal of Medicine*, 119, S10–S16. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.01.009>
- Petersen, M. C., Vatner, D. F., & Shulman, G. I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 13, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.80>
- Piché, M. E., Tchernof, A., & Després, J. P. (2020). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. In *Circulation Research* (Vol. 126, Issue 11). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101>
- Poulos, S. P., Dodson, M. V., & Hausman, G. J. (2010). Cell line models for differentiation: Preadipocytes and adipocytes. In *Experimental Biology and Medicine* (Vol. 235, pp. 1185–1193). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010063>
- Powell-Wiley, T. M., Poirier, P., Burke, L. E., Després, J. P., Gordon-Larsen, P., Lavie, C. J., Lear, S. A., Ndumele, C. E., Neeland, I. J., Sanders, P., & St-Onge, M. P. (2021). Obesity and Cardiovascular Disease A Scientific Statement From the American Heart Association. In *Circulation* (Vol. 143, Issue 21). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000973>
- Ren, J., Wu, N. N., Wang, S., Sowers, J. R., & Zhang, Y. (2021). Obesity cardiomyopathy: Evidence, mechanisms, and therapeutic implications. In *Physiological Reviews* (Vol. 101, pp. 1745–1807). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2020>
- Riaz, T., Akram, M., Laila, U., Zainab, R., Talha Khalil, M., Iftikhar, M., Ahmet Ozdemir, F., Sołowski, G., Altable, M., Sfera, A., Khalifa Ibrahim, H., & Parmar, P. (2023). Causes, risks factors and medical consequences of obesity. *Iaim*, 10(8).
- Roh, H. C., Kumari, M., Taleb, S., Tenen, D., Jacobs, C., Lyubetskaya, A., Tsai, L. T. Y., & Rosen, E. D. (2020). Adipocytes fail to maintain cellular identity during obesity due to reduced PPAR γ activity and elevated TGF β -SMAD signaling. *Molecular Metabolism*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101086>
- Rosenthal, R. J., Morton, J., Brethauer, S., Mattar, S., De Maria, E., Benz, J. K., Titus, J., & Sterrett, D. (2017). Obesity in America. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, 13(10). <https://doi.org/10.1016/j.soard.2017.08.002>

- Satman, İ. (2016). Türkiye’de Obezite Sorunu. *Spec Top.*
- Schübel, R., Nattenmüller, J., Sookthai, D., Nonnenmacher, T., Graf, M. E., Riedl, L., Schlett, C. L., Von Stackelberg, O., Johnson, T., Nabers, D., Kirsten, R., Kratz, M., Kauczor, H. U., Ulrich, C. M., Kaaks, R., & Kühn, T. (2018). Effects of intermittent and continuous calorie restriction on body weight and metabolism over 50 wk: A randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, *108*(5). <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy196>
- Simon-Szabó, L., Kokas, M., Mandl, J., Kéri, G., & Csala, M. (2014). Metformin attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress, serine phosphorylation of IRS-1 and apoptosis in rat insulinoma cells. *PLoS ONE*, *9*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097868>
- Şimsir, I. Y., Soyaltın, U. E., & Yılmaz, C. (2018). Obesity and breast cancer: Adipose tissue, adipocytokines, chronic inflammation, and hypoxia. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, *22*(4). <https://doi.org/10.25179/tjem.2017-57808>
- Sirtori, C. R., Castiglione, S., & Pavanello, C. (2024). Metformin: From diabetes to cancer to prolongation of life. In *Pharmacological Research* (Vol. 208). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107367>
- Smith, D. M., Choi, J., & Wolfgang, M. J. (2024). Tissue specific roles of fatty acid oxidation. *Advances in Biological Regulation*. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2024.101070>
- Song, T., & Kuang, S. (2019). Adipocyte dedifferentiation in health and diseases. In *Clinical Science* (Vol. 133, pp. 2107–2119). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/CS20190128>
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Brown, A., Dennis, E. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., & Subramaniam, S. (2007). LMSD: LIPID MAPS structure database. *Nucleic Acids Research*, *35*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl838>
- Sysoeva, V. Y., Lazarev, M. A., Kulebyakin, K. Y., Semina, E. V., & Rubina, K. A. (2023). Molecular and Cellular Mechanisms Governing Adipogenic Differentiation. *Russian Journal of Developmental Biology*, *54*, S10–S22. <https://doi.org/10.1134/s1062360423070068>
- Szymczak-Pajor, I., Wenclewska, S., & Sliwińska, A. (2022). *Metabolic Action of Metformin*. <https://doi.org/10.3390/ph15070810>
- Tahri-Joutey, M., Andreoletti, P., Surapureddi, S., Nasser, B., Cherkaoui-Malki, M., & Latruffe, N. (2021). Mechanisms mediating the regulation of peroxisomal fatty acid beta-oxidation by ppar α . *International Journal of Molecular Sciences*, *22*. <https://doi.org/10.3390/ijms22168969>

- Todoric, J., Di Caro, G., Reibe, S., Henstridge, D. C., Green, C. R., Vrbanc, A., Ceteci, F., Conche, C., McNulty, R., Shalpour, S., Taniguchi, K., Meikle, P. J., Watrous, J. D., Moranchel, R., Najhawan, M., Jain, M., Liu, X., Kisseleva, T., Diaz-Meco, M. T., ... Karin, M. (2020). Fructose stimulated de novo lipogenesis is promoted by inflammation. *Nature Metabolism*, 2, 1034–1045. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0261-2>
- TÜİK Kurumsal. (n.d.). <https://Data.Tuik.Gov.Tr/Bulten/Index?P=Turkiye-Health-Survey-2022-49747&dil=2>.
- TÜRKİYE BESLENME VE SAĞLIK ARAŞTIRMASI (TBSA). (2010). www.tirajbasim.com
- van Gerwen, J., Shun-Shion, A. S., & Fazakerley, D. J. (2023). Insulin signalling and GLUT4 trafficking in insulin resistance. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 51, pp. 1057–1069). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20221066>
- van Stee, M. F., de Graaf, A. A., & Groen, A. K. (2018). Actions of metformin and statins on lipid and glucose metabolism and possible benefit of combination therapy. In *Cardiovascular Diabetology* (Vol. 17). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0738-4>
- Wang, D. F., Ma, Y. J., Lang, X. E., & Zhang, X. Y. (2025). Unraveling the prevalence and key influencers of metabolic syndrome in Drug-Naïve, first-episode major depressive disorder patients with psychotic symptoms: A decision tree modeling approach. *Psychiatry Research*, 348. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2025.116494>
- Wang, Y., An, H., Liu, T., Qin, C., Sesaki, H., Guo, S., Radovick, S., Hussain, M., Maheshwari, A., Wondisford, F. E., O'Rourke, B., & He, L. (2019). Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK. *Cell Reports*, 29(6), 1511-1523.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.09.070>
- WHO. (2015). WHO | Mean Body Mass Index (BMI). In *Who*.
- WHO. (2021). *World Health Organization Obesity and Overweight. WHO Newsroom Fact Sheets: 2021*. 9 June.
- WHO. (2023). *Fact Sheet-malnutrition*. WHO.
- Xu, P., Li, J., Liu, J., Wang, J., Wu, Z., Zhang, X., & Zhai, Y. (2017). Mature adipocytes observed to undergo re proliferation and polyploidy. *FEBS Open Bio*, 7, 652–658. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12207>
- Yerevanian, A., & Soukas, A. A. (2019). Metformin: Mechanisms in Human Obesity and Weight Loss. *Current Obesity Reports*, 8(2), 156. <https://doi.org/10.1007/S13679-019-00335-3>

- Younossi, Z. M., Stepanova, M., Al Shabeeb, R., Eberly, K. E., Shah, D., Nguyen, V., Ong, J., Henry, L., & Alqahtani, S. A. (2024). The changing epidemiology of adult liver transplantation in the United States in 2013-2022: The dominance of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and alcohol-associated liver disease. *Hepatology Communications*, 8.
<https://doi.org/10.1097/HC9.0000000000000352>
- Yudhani, R. D., Sari, Y., Nugrahaningsih, D. A. A., Sholikhah, E. N., Rochmanti, M., Purba, A. K. R., Khotimah, H., Nugrahenny, D., & Mustofa, M. (2023). In Vitro Insulin Resistance Model: A Recent Update. In *Journal of Obesity* (Vol. 2023). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2023/1964732>
- Zebisch, K., Voigt, V., Wabitsch, M., & Brandsch, M. (2012). Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Analytical Biochemistry*, 425, 88–90.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.005>
- Zhu, Q., An, Y. A., & Scherer, P. E. (2022). Mitochondrial regulation and white adipose tissue homeostasis. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 32, pp. 351–364). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.10.008>

EKLER

Ek A: Çalışmada Kullanılan Cihazların Listesi

Tablo A.1: Kullanılan Cihazların Listesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Buz Makinesi	AF80	Scotsman
CO ₂ İnkübatör	50116047	Thermo Fisher Scientific
Derin Dondurucu	Ultra Low Temperature Freezer	ARCTIKO
SDS-PAGE Donanımları		BioRad
Floresan Ataçmanlı Mikroskop	IX71	Olympus
qRT-PCR Cihazı	CFX Connect	BioRad
Hassas Tartım Cihazı	LE6202S	Sartorius
Hemositometre	Neubauer Improved	Assistent Germany
İnvert Mikroskop	XDS-1B	SOIF
Laminar Flow	HERASAFE KS	Thermo Fisher Scientific
Çalkalayıcı	GyroTwister	Labnet
Santrifüj Cihazı	NF 200	Nüve
Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı	ChemiDoc MP System 1708280	BioRad
Spektrofotometre	IMPLEN NanoPhotometer	BO-GA
Termal Döngüleyici	MyCycler Thermal Cycler	BioRad
Distile Su Cihazı	Direct-Q 5UV	Labor Teknik
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer Innova U725	New Brunswick Scientific

Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart
pH Metre	Orion STAR A211	Thermo Scientific
Otoklav Cihazı	GR60SA	Zealway
Mini Spin Cihazı	Fisherbrand 15358266	Thermo Scientific
Mikroplaka Okuyucu	iMark	BioRad
Buharlı Sterilizatör	OT 90L	Nüve
Isıtıcı blok	HB120-S	DLAB
Mikrodalga Fırın	MD 595	Arçelik

Ek B: Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Donanımları

Tablo B.1: Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Donanımları Listesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
3T3-L1	CL-173	ATCC
25 cm ² Hücre Kültürü Kapları	90026	TPP
75 cm ² Hücre Kültürü Kapları	90076	TPP
60 mm Hücre Kültürü Kapları	93060	TPP
100 mm Hücre Kültürü Kapları	704001	NEST
Kriyovial Tüp	5042000C	CAPP
96 Kuyucuklu Hücre Plakaları	92096	TPP
6 Kuyucuklu Hücre Plakaları	92006	TPP
15 ml Santrifüj Tüpleri	91015	TPP
50 ml Santrifüj Tüpleri	91050	TPP
Hücre kazıyıcı	280 mm	Greiner Bio-One
22 µm şırınga filtresi	99722	TPP
Enjektör	694442588871, Yeşil uç iğneli 21G	Astraject
Pipet ucu (1000 µl)	5130130	CAPP
Pipet ucu (200 µl)	4130075	CAPP
Pipet ucu (10 µl)	5030010	CAPP

Ek C: Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Listesi

Tablo C.1: Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Listesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Tris Baz	648310	Calbiochem
Tris-HCl	648317	Calbiochem
Hidroklorik asit	100317	Merck
Sodyum klorür	S7653-5kg	Sigma-Aldrich
Üre	161-0731	BioRad
Triton X-100	T8787-100 ml	Sigma-Aldrich
Sığır Serum Albümin (BSA)	A2153	Sigma Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G-250	A3480	Applichem
Metanol	24229	Sigma-Aldrich
Akrilamid/Bis-akrilamid (%30 37,5:1)	A0011	BioBasic
APS	A2941	AppliChem
TEMED	A1148	AppliChem
İzopropanol	34863	Sigma-Aldrich
Gliserol	GB0232	BioBasic
Protein Marker	PageRuler Plus 26620	Thermo Scientific
PVDF membran	88518	Thermo Scientific
Yağsız süt tozu	1172KG001	Biofroxx
Tween-20	822184	Merck
p-Kumarik Asit	C9008	Sigma Aldrich
Luminol	A2185	AppliChem
Ponceu S	A1405	AppliChem
Hidrojen Peroksit H ₂ O ₂	107209	Merck
EDTA	A2937	AppliChem
Agaroz	35-1010	PeqLab BioTech
100 bp DNA marker	GeneRuler SM0241	Thermo Scientific
1kb DNA marker	Gene Ruler SM0311	Thermo Scientific
RedSafe	21141	Intron Biotechnology
HRP-Streptavidin Konjugat Solüsyonu	N100	Thermo Scientific
FBS	10500-064	Gibco
Penisilin-Streptomisin	P06-07350	PAN BioTech
DMEM Besiyeri	41966-029	Gibco
Deksametazon (DEX)	A10299	Adooq Bioscience
3-isobütül 1-metilksantin (IBMX)	15879	Sigma Aldrich
Bovine Calf Serum (BCS)	22C239	Sigma Aldrich
Tripsin EDTA	SH30042.01	Hyclone
DMSO	D8418	Sigma Aldrich

PureZol RNA İzolasyon Ajanı	7326890	BioRAD
Kloroform	UNI1888	AppliChem
iScript cDNA Sentez Kiti	1708891	BioRad
MTT ajanı	3580GR005	Biofrox
iQ SYBR Green Supermix	170-8880	BioRad
M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent	78501	Thermo Scientific
DNA Jel Yükleme Boyası (6X)	R0611	Thermo Scientific
DEPC	A0881	AppliChem

Ek D: Çalışmada Kullanılan Tamponların İçeriği

Tablo D.1: Çalışmada Kullanılan Tamponların İçeriği

Memeli Hücre Lizis Tamponu (Cell lysis buffer, CLB)	10 ml M-PER Memeli Protein Ekstraksiyon ajanına 1 tablet Proteaz inhibitör eklenerek hazırlanmıştır. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
Bovine Serum Albumin (BSA, Protein Standardı)	0,015 gram BSA tartılmış, 10 ml distile suda çözülmüş ve 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
Bradford Ajanı Solüsyonu	0,05 gram Coomassie Brilliant Blue (G 250) boyası tartılarak 50 ml metanolde çözdürmüştür. Üzerine 100 ml %85 fosforik asit (H3PO4) eklenmiş ve hazırlanan çözelti 500 ml distile suya eklendikten sonra filtre kağıdı ile süzöldükten sonra 350 ml distile su ile son hacim 1 litreye tamamlanmıştır. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
Amonyum Persülfat (APS)	0,1 gram amonyum persülfat tartılmış ve 1 ml distile suda çözdürülerek kullanılmıştır. -20 °C'de muhafaza edilmiştir.
5X Laemmlı Yükleme Tamponu	60 mM Tris-HCl pH:6,8, % 2 SDS, % 10 Gliserol, % 5 β-merkaptöetanol, %0,01 Bromfenol mavisi karıştırılarak hazırlanır. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
10 X TBS	10X konsantrasyonda TBS tamponu hazırlamak için 86,6 gram NaCl ve 12,11 gram Tris tartılmış, 500 ml distile suda çözdürülmüş ve pH'ı 8'e ayarlandıktan

	sonra son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:10 seyreltilerek 1X konsantrasyonu dönüştürülmüş ve 1X olarak kullanılmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
10X PBS	10X konsantrasyonda PBS tamponu hazırlamak için 80 gram NaCl, 2 gram KCl, 14,4 gram Na ₂ HPO ₄ ve 2,4 gram KH ₂ PO ₄ , 500 ml distile suda çözdürülmüş ve pH'ı 7,4'e ayarlandıktan sonra son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:10 seyreltilerek 1X konsantrasyonu dönüştürülmüş ve 1X olarak kullanılmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
10X TBE	10X konsantrasyonda TBE tamponu hazırlamak için 108 gram Tris ve 55 gram Borik asit 500 ml distile suda çözdürülmüş, 40 ml 0,5 M EDTA (pH:8) eklenmiş ve son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:10 seyreltilerek 1X konsantrasyonu dönüştürülmüş ve 1X olarak kullanılmıştır.
TBS-Tween (TBS-T)	500 ml 1X TBS ile 500 µl Tween TM -20 karıştırılarak hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
%5 Bloklama Sütü	2,5 gram yağsız süt tozu tartılmış ve 50 ml'ye TBS-T ile tamamlanmıştır.
Kumarik Asit	0,15 gram P-kumarik asit 10 ml DMSO'da çözdürülerek hazırlanmıştır. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
Luminol	0,44 gram Luminol 10 ml DMSO'da çözdürülerek hazırlanmış ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.
Membran Stripleme Tamponu	15 gram glisin, 1 gram SDS ve 10 ml Tween-20 yaklaşık 800 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'ı 2,2'ye ayarlanmış ve son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.
PBB Tamponu	0,1 gram BSA tartılmış ve 20 ml 1X PBS içerisinde çözümlenerek PBB çözeltisi

	hazırlanmıştır. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
Permeabilizasyon Çözeltisi	10 µl Triton-X-100 10 ml 1X PBS ile karıştırılarak hazırlanmıştır. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.
İmmunofloresan Bloklama Tamponu	0,1 gram BSA, 5 ml 1X PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo D.2: %4'lük ve %12'lik SDS- Poliakrilamid Jellerinin İçeriği

Malzemeler	%12'lik Yürütme Jeli (Alt Jel)	%4'lük Yükleme Jeli (Üst Jel)
Steril su	1,7 ml	1,5 ml
Tris HCl	1,25 ml (1,5 M, pH:8,8)	0,625 µl (0,5 M, pH:6,8)
%10 SDS	50 µl	25 µl
Akrilamid/Bis-akrilamid (%30)	2 ml	335 µl
%10 APS	40 µl	25 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl

Tablo D.3: Kemilüminesans Görüntüleme Tampon İçerikleri

Malzemeler	Tampon A	Tampon B
Steril su	9 ml	9 ml
Tris Baz pH:8,5	1 ml	1 ml
Kumarik Asit	90 µl	-
Luminol	200 µl	-
H ₂ O ₂	-	10 µl

Tablo D.4: Gradient PCR Örneklerinin Hazırlanması

MALZEME	Miktar
2X Master Mix	12,5 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
cDNA	1000 ng/ µl
Su	25 µl tamamlayacak kadar

Tablo D.5: Gradient PCR 'da Kullanılan Protokol

Reaksiyon	Sıcaklık	Süre	
İlk Denatürasyon	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	95 °C	1 dk	} 35 döngü
Bağlanma	65,0°C - 50,0 °C	45 sn	
Uzama	72 °C	1 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	

Tablo D.6: qRT-PCR 'da Kullanılan Protokol

Reaksiyon	Sıcaklık	Süre	
İlk Denatürasyon	95 °C	5 dk	
Denatürasyon	95 °C	10 sn	} 40 döngü
Bağlanma	63,8 °C	30 sn	
Uzama	72 °C	30 dk	
Son Uzama	72°C	10 dk	