



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**3T3-L1 PREADİPOZİTLERİNİN DİFERANSİYASYON,
PROLİFERASYON, VİABİLİTE ve MİGRASYONU ÜZERİNDE
APIGENİN'İN ETKİSİ: WNT YOLAĞININ OLASI KATKISI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE COŞKUNCA

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN
TEMMUZ-2023

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**3T3-L1 PREADİPOZİTLERİNİN DİFERANSİYASYON,
PROLİFERASYON, VİABİLİTE ve MİGRASYONU ÜZERİNDE
APIGENİN'İN ETKİSİ: WNT YOLAĞININ OLASI KATKISI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE COŞKUNCA
ORCID ID: 0000-0001-5821-9556

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ A. SENCER YURTSEVER

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN
TEMmuz- 2023

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

...../...../ 2023

İmza / Signature

Tuğçe COŞKUNCA

ÖZET

3T3-L1 PREADİPOZİTLERİNİN DİFERANSİYASYON, PROLİFERASYON, VİABİLİTE ve MİGRASYONU ÜZERİNDE APİGENİN'İN ETKİSİ: WNT YOLAĞININ OLASI KATKISI

Obezitenin oluşumunda adiposit hipertrofisi ve preadipositlerin adipositlere diferansiye olması rol almaktadır. Maydanoz, kereviz, turunçgiller gibi meyve, sebze ve bitkilerde bulunan apigeninin, adiposit diferansiyasyonunu baskılayarak obeziteyi önleyebileceği bildirilmiştir. Ancak altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca, apigeninin preadipositlerin proliferasyonu ve migrasyonu üzerinde etkisini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda apigeninin 3T3-L1 preadipositlerinde hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve migrasyonu üzerine etkilerini incelemeyi ve oluşacak etkiye Wnt sinyal yolağının aracılık edip etmediğini araştırmayı amaçladık. Wnt inhibitörü olarak niklozamid kullanıldı. Hücre viabilite ve proliferasyonu MTT analizi ile, diferansiyasyon Oil Red O boyama ile değerlendirildi. Apigenin (2,5, 5 ve 10 μ M) ve niklozamidin (0,25 μ M) hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadı. Proliferasyon, diferansiyasyon ve migrasyon deneylerinde belirli zaman aralıklarında (diferansiyasyon deneylerinde diferansiyasyon protokolünün 0-4, 4-8 ve 0-8'nci; proliferasyon deneylerinde ise 0-2, 2-4 ve 0-4'ncü günleri boyunca; viabilite ve migrasyon deneylerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca) niklozamid varlığında veya yokluğunda apigenin uygulandı. Apigenin 10 μ M konsantrasyonda diferansiyasyonun tüm zaman noktalarında diferansiyasyonu anlamlı olarak baskıladı. Niklozamid ön uygulaması bu etkiyi ortadan kaldırdı. Proliferasyon sürecinin 0-2. ve 0-4'ncü günlerinde 10 μ M apigenin uygulanması hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttı. Niklozamid ön uygulaması bu etkiyi ortadan kaldırdı. Migrasyon deney serilerinde 24 saat boyunca apigenin ve/veya niklozamid uygulandığında migrasyonda anlamlı bir fark gözlenmedi. Apigenin 48 saat boyunca uygulandığında 2,5 ve 5 μ M konsantrasyonda migrasyonda anlamlı bir artış gözlemlendi, ancak 10 μ M apigenin uygulanması anlamlı bir etki göstermedi. Niklozamid ön uygulaması apigeninin 2,5 ve 5 μ M konsantrasyonda oluşturduğu hücre migrasyonunu artırıcı etkisini ortadan kaldırdı. Apigenin 72 saat boyunca uygulandığında yalnızca 5 μ M konsantrasyonda migrasyonda anlamlı bir artışa neden oldu. Bu etki niklozamid tarafından ortadan kaldırıldı. Bu bulgulara göre, apigeninin, 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin canlılığını etkilemeden diferansiyasyonu ve proliferasyonunu baskıladığı; hücre migrasyonunu arttırdığı ve bu etkilere Wnt sinyal yolağı aktivasyonunun aracılık ediyor olabileceği düşünüldü. Bununla birlikte, bu varsayımların doğrulanması için daha detaylı çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: 3T3-L1, Apigenin, Niklozamid, Wnt Sinyal Yolağı, Diferansiyasyon, Proliferasyon, Migrasyon

ABSTRACT

Adipocyte hypertrophy and differentiation of preadipocytes to adipocytes play a role in the formation of obesity. It has been reported that apigenin, which is found in fruits, vegetables and plants such as parsley, celery, and citrus fruits, can prevent obesity by suppressing adipocyte differentiation. However, the underlying mechanisms have not been fully elucidated. In addition, there are no studies showing the effect of apigenin on the proliferation and migration of preadipocytes. In our study, we aimed to examine the effects of apigenin on cell proliferation, differentiation and migration in 3T3-L1 preadipocytes and to investigate whether the effect is mediated by the Wnt signaling pathway. Niclosamide was used as Wnt inhibitor. Cell viability and proliferation were evaluated by MTT analysis, differentiation by Oil Red O staining. Apigenin (2,5, 5, and 10 μ M) and niclosamide (0,25 μ M) had no significant effect on cell viability. At certain time intervals in proliferation, differentiation and migration experiments (0-4, 4-8 and 0-8 days of the differentiation protocol in differentiation experiments; during 0-2, 2-4 and 0-4 days in proliferation experiments; viability and migration apigenin was administered in the presence or absence of niclosamide (for 24, 48, and 72 hours). Apigenin at 10 μ M concentration significantly suppressed differentiation at all time points of differentiation. Niclosamide pre-application eliminated this effect. 0-2 of the proliferation process. Administration of 10 μ M apigenin on days 0-4 significantly reduced cell proliferation. Niclosamide pre-application eliminated this effect. In the series of migration experiments, no significant difference in migration was observed when apigenin and/or niclosamide was administered for 24 hours. A significant increase in migration was observed at 2.5 and 5 μ M concentrations when apigenin was administered for 48 hours, but administration of 10 μ M apigenin did not show a significant effect. Niclosamide pre-application abolished the cell migration-increasing effect of apigenin at 2,5 and 5 μ M concentrations. Apigenin caused a significant increase in migration at a concentration of only 5 μ M when administered for 72 hours. This effect was abolished by niclosamide. According to these findings, apigenin suppresses the differentiation and proliferation of 3T3-L1 preadipocyte cells without affecting the viability; It was thought that it increased cell migration and that these effects might be mediated by the activation of the Wnt signaling pathway. However, more detailed studies are required to confirm these assumptions.

Keywords: 3T3-L1, Apigenin, Niclosamide, Wnt Signaling Pathway, Differentiation, Proliferation, Migration

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanmasından bitimine kadar tüm aşamalarında kıymetli bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, yol gösteren, sabırla destek olup yardımını esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi A. Sencer YURTSEVER 'e,

Her zaman değerli fikirlerini belirtip, bizlere yön gösteren Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAFŞAR 'a, hocam Prof. Dr. İsmail ÜN 'e ve hocam Doç. Dr. Rukiye Nalan TİFTİK 'e

Tez sürecim dahil tüm yüksek lisans sürecimde bana yol arkadaşlığı yapan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen başta değerli dostum Özge KELEŞ olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca beni cesaretlendirip güç veren, sevgi ve desteklerini hep hissettiğim annem Hatice COŞKUNCA, ablam Dilek BERKİ, kardeşlerim Melisa COŞKUNCA ve Furkan COŞKUNCA 'ya,

Hayatımın her alanında olduğu gibi, tez çalışmamı hazırlarken de yanımda olan, sabır ve desteğiyle her zaman motivasyonumu sağlayan nişanlım Mehmet Kemal SAVAŞ 'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 2021-2-TP2-4506 proje kodu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Obezite	3
2.2. Adipoz Doku	5
2.3. Adipoz Dokunun Temel Fonksiyonları	5
2.4. Adipoz Dokunun Sınıflandırılması ve İşlevleri	5
2.5. Adipoz Dokunun Endokrin Fonksiyonu	8
2.6. Adipogenez	9
2.7. Apigenin	11
2.8. WNT Sinyal Yolağı	12
3. MATERYAL ve METOD	15
3.1. 3T3-L1 Preadiposit Hücre Kültürü	15
3.2. Hücrelerin Pasajlanması	16
3.3. Hücre Sayımı	16
3.4. Apigenin ve Niklozamid Çözeltilerinin Hazırlanması	17
3.5. MTT Çalışma Solüsyonu ve Çözücü Solüsyonlarının Hazırlanması	17
3.6. MTT Analizi	17
3.7. Viabilite Deney Serisi	18
3.8. Proliferasyon Deney Serisi	18
3.9. Diferansiyasyon Deney Serisi	19
3.9.1. Oil Red O Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması	20
3.9.2. Oil Red O Boyama Metodunun Uygulanması	21
3.10. Migrasyon Deney Serisi	21
3.10.1. Migrasyon Analizi	22
3.11. İstatistiksel Analiz	23

	Sayfa
4. BULGULAR	24
4.1. Viabilite Deney Sonuçları	24
4.1.1. 24 Saat	24
4.1.2. 48 Saat	25
4.1.3. 72 Saat	25
4.2. Proliferasyon Deney Sonuçları	26
4.2.1. 0-2'inci gün	26
4.2.2. 2-4'üncü gün	27
4.2.3. 0-4'üncü gün	28
4.3. Diferansiyasyon Deney Sonuçları	29
4.3.1. 0-4'üncü gün	29
4.3.2. 4-8'inci gün	30
4.3.3. 0-8'inci gün	31
4.4. Migrasyon Deney Sonuçları	32
4.4.1. 24 Saat	32
4.4.2. 48 Saat	36
4.4.3. 72 Saat	37
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	39
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Adiposit hipertofi ve hiperplazisi	3
Şekil 2.2. Adiposit hücrelerinin morfolojik farkları	6
Şekil 2.3. Adipokinlerin rol aldığı fizyolojik süreçler	13
Şekil 2.4. Apigeninin kimyasal yapısı	11
Şekil 2.5. Niklozamidin kimyasal yapısı	14
Şekil 2.4. Mezenkimal kök hücrelerin kemiğe (osteogenez), yağ dokusuna (adipogenez), kıkırdak (kondrogenez) ve kaslara (miyogenez) farklılaşma potansiyeli	14
Şekil 2.5. Migrasyon Deneyi.	15
Şekil 4.1. Apigenin ve niklozamid uygulamasının 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin viabilitesi üzerinde etkisi (24 saat).	23
Şekil 4.2. Apigenin ve niklozamid uygulamasının 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin viabilitesi üzerinde etkisi (48 saat).	24
Şekil 4.3. Apigenin ve niklozamid uygulamasının 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin viabilitesi üzerinde etkisi (72 saat).	25
Şekil 4.4. Niklozamid varlığında ve yokluğunda apigenin uygulanmasının 3T3-L1 preadiposit hücreleri proliferasyonu üzerine etkisi (0-2'nci gün).	26
Şekil 4.5. Niklozamid varlığında ve yokluğunda apigenin uygulanmasının 3T3-L1 preadiposit hücreleri proliferasyonu üzerine etkisi (2-4'üncü gün).	27
Şekil 4.6. Niklozamid varlığında ve yokluğunda apigenin uygulanmasının 3T3-L1 preadiposit hücreleri proliferasyonu üzerine etkisi (0-4'üncü gün).	28
Şekil 4.7. Niklozamid varlığında ve yokluğunda apigenin uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonu üzerine etkisi. (0-4'üncü gün)	29
Şekil 4.8. Niklozamid varlığında ve yokluğunda apigenin uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri diferansiyasyonu üzerine etkisi (4-8'inci gün).	30
Şekil 4.9. Niklozamid varlığında ve yokluğunda apigenin uygulanmasının 3T3-L1 preadipositleri diferansiyasyonu üzerine etkisi (0-8'inci gün).	26
Şekil 4.10. Niklozamid varlığında ve yokluğunda apigenin uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri migrasyonu üzerine etkisi (0-72. saat).	27

	Sayfa
Şekil 4.11. Niklozamid varlığında ve yokluğunda apigenin uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri migrasyonu üzerine etkisi (24. saat).	28
Şekil 4.12. Niklozamid varlığında ve yokluğunda apigenin uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri migrasyonu üzerine etkisi (48. saat).	29
Şekil 4.13. Niklozamid varlığında ve yokluğunda apigenin uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri migrasyonu üzerine etkisi (72. saat).	30

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma/Simgesi	Tanım
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
VKİ	Vücut Kitle İndeksi
ATLAS	Avrupa Kardiyovasküler Hastalık İstatistikleri
UCP-1	Uncoupling Protein-1
FFA	Free Fatty Acids
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör-A
IL-6	İnterlökin-6
IL-1 β	İnterlökin-1 β
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
TGF- β	Transforming Growth Factor-B
PPAR- γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ
C/EPB	CCAAT-Enhancer-Binding Protein
C/EPB α	CCAAT-Enhancer-Binding Protein-Alpha
C/EPB β	CCAAT-Enhancer-Binding Protein-Beta
C/EPB δ	CCAAT-Enhancer-Binding Protein-Delta
KFL	Krüppel-Like Factor
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1
Wnt	Wingless-Type
Fz	Frizzled
LRP 5/6	Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5/6
Dsh	Disheveled
CK-1	Casein Kinaz-1
PP2A	Protein Phosphatase 2A
GSK-3 β	Glycogen Synthase Kinase-3 β
APC	Adenomatous Polyposis Coli
TCF	T-Cell Factor
LEF	Lymphoid Enhancer-Binding Factor
BCS	Bovine Calf Serum
FBS	Fetal Bovine Serum
IBMW	İzobütilmetilksantin
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
DMSO	Dimetilsülfoksit
PBS	Phosphate Buffered Saline

Kısaltma/Simge

Tanım

aP2	Fatty Acid Binding Protein
SCD	Stearoyl-CoA Desaturase
AMPK	Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase



1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün anormal veya aşırı miktarda yağ birikimi olarak tanımladığı obezite, sağlığı etkileyen küresel bir hastalıktır (DSÖ, 2016). Sağlıksız beslenme, fiziksel aktivite yetersizliği ve genetik yatkınlık gibi faktörler obezitenin nedenleri arasında sayılmaktadır [1]. Temel nedeni ise enerji alımı ve kullanımı arasındaki dengesizlik olarak bilinmektedir [2]. Obezitede görülen vücut yağ kitlesindeki artış, oluşturduğu anatomik ve metabolik etkilerle Tip-2 diyabet, insülin direnci, osteoartrit, uyku apnesi ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok patolojik duruma yol açabilmektedir [3]. Ancak ılımlı bir kilo kaybı bile kardiyovasküler hastalıklar, uyku apnesi ve hipertansiyon gibi birçok komorbidite riskinin azalmasını sağlayabilmektedir [4]. Diyet tedavisi, cerrahi tedavi ve ilaç tedavisi obezitenin tedavileri arasında yer almaktadır. Ancak son zamanlarda yüksek maliyetler ve olası yan etkilerden duyulan memnuniyetsizlikler gibi nedenlerden dolayı obezite tedavisinde doğal ürünlerin potansiyeli dikkat çekmekte ve araştırılmaktadır [5, 6]. Bu ürünlerin obeziteyi önleyici ve tedavi edici, güvenilir ajanlar geliştirebilmek için faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Çeşitli bitki, sebze, meyve, tohumlar, tahıllar ve baklagillerin organizmada yaşamsal rol oynayan hücre farklılaşması, proliferasyonu, apoptoz gibi fizyolojik süreçleri farklı şekillerde etkilediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan fitokimyasallar içerdiği bilinmektedir [7]. Yapılan çalışmalarda birçok fitokimyasalın preadipositlerin adipogenez sürecinde etkili rol oynadığı bildirilmiştir [8]. Fitokimyasallar içerisinde yaygın olarak bulunan ve geniş bir grubu oluşturan flavonoidler, potansiyel antikanser, antiinflamatuvar, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri bulunduğu gösterilmiş besin takviyeleridir [8]. Bir flavonoid olan ve birçok bitkinin içeriğinde bulunduğu gösterilen apigenin (5,7-dihidroksi-2-(4- hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on); soğan, maydanoz, kereviz, portakal ve greyfurt ve papatyanın içeriğinde yüksek düzeyde bulunmaktadır [9]. Antikanser, antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri olduğu bilinen apigeninin, çok hücreli organizmaların gelişim, üreme ve yaşamsallığının korunması için önemli bir süreç olan hücre diferansiyasyonu üzerinde de etkili olduğu bilinmektedir. Mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik diferansiyasyonunu artırmasının yanı sıra myoblastların myositlere diferansiyasyonunu indüklediği gösterilen apigeninin preadipositlerin diferansiyasyonunu ise baskıladığı gösterilmiştir [10, 11]. Apigeninin, preadiposit diferansiyasyonu üzerinde gözlenen etkisi sebebiyle obezite üzerinde etkili bir ajan olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte preadiposit diferansiyasyonu üzerine baskılayıcı etkisine karışan sinyal yolları tam olarak aydınlatılamamıştır.

Hücre bölünmesi, proliferasyonu, farklılaşması ve hücre sağ kalımı gibi hücre fonksiyonlarda rol alan Wnt (Wingless-type) sinyal yolağının mezenkimal kök hücrelerin kas ve kemiklere farklılaşmasını desteklerken; adipositlere farklılaşmasını inhibe ettiği bilinmektedir [8, 12]. Hücre proliferasyonu üzerine etkileri ise tartışmalıdır. Wnt sinyal yolağı aktivasyonunun insan mezenkimal hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [9]. Ancak, fare serebellar nöral kök hücreleri gibi çeşitli hücre hatlarında Wnt sinyal yolu aktivasyonunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [13]. Wnt sinyal yolağının aktivasyonunun preadiposit diferansiyasyonunu baskıladığını gösteren çalışmalar bulunmakla beraber Wnt sinyal yolağının preadipositlerin proliferasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır [14, 15].

Apigenin, kanser hücre hattında, Wnt genlerinin ekspresyonunu inhibe ederek antitümör etkinlik göstermiştir [16, 17]. Farklı bir çalışmada ise apigenin, mezenkimal kök hücrelerde, Wnt sinyalinin bazı hedef genlerinin ekspresyonunu artırarak Wnt/B-katenin sinyal yolağını aktive ettiği, mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını desteklediği bildirilmiştir [11]. Bu etkileri göz önüne alındığında Wnt sinyal yolağının apigeninin preadiposit diferansiyasyonu üzerine baskılayıcı etkisine aracılık ediyor olabileceği düşünülebilir. Bununla birlikte, bilimsel literatürde apigeninin preadiposit diferansiyasyonunu baskılayıcı etkisine Wnt sinyal yolağının karışıp karışmadığının araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle çalışmamızda apigeninin diferansiyasyon sürecinin farklı zaman aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarda uygulanmasının 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin diferansiyasyon, proliferasyon ve migrasyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi ve bu olası etkiye Wnt sinyal yolağının katkısının araştırılması planlanmıştır. Çalışmamızda Wnt sinyal yolağı inhibitörü olarak niklozamid kullanılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

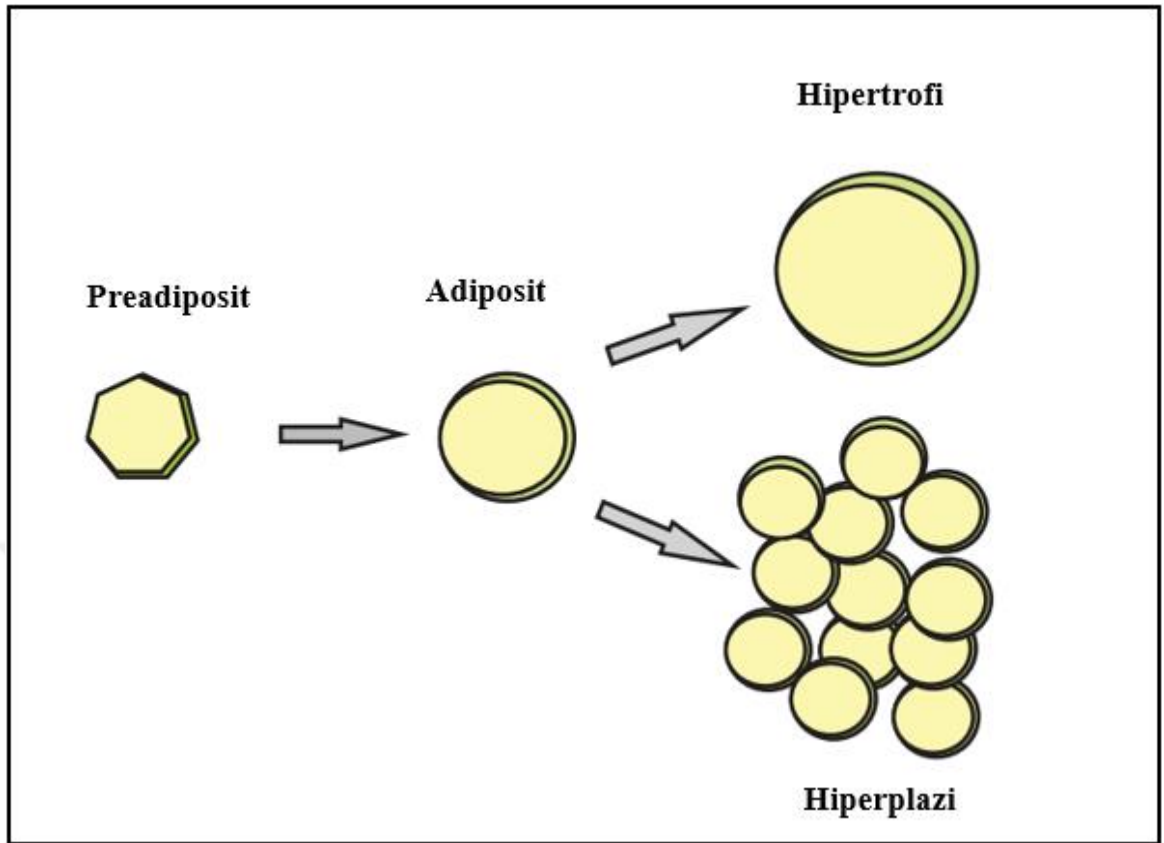
2.1 Obezite

Obezitenin bir göstergesi olan vücut kitle indeksi (VKİ), vücut ağırlığının boy uzunluğunun karesine (kg/m^2) bölünmesiyle hesaplanmaktadır. 18,5-24,9 aralığında VKİ'ye sahip bireyler normal kiloda, 25'in üzerindeki bireyler fazla kilolu, 30'un üzerinde olanlar obez kabul edilmektedir [7].

DSÖ'ye göre, obezite ciddi bir metabolik hastalık olarak görülmektedir ve prevalansı aşırı beslenme ve yetersiz fiziksel aktivite nedeniyle son 40 yılda neredeyse 3 katına çıkmıştır [8]. DSÖ'nün 2022 raporuna göre, Avrupa ülkelerinde yetişkinlerin %59'u fazla kilolu ya da obez sınıfındadır. Bu düzey erkeklerde %63, kadınlarda ise %54'tür [12]. Avrupa Kardiyovasküler Hastalık İstatistikleri 'nin (ATLAS) 2018 yılındaki araştırmasına göre Türkiye'de obezite oranı kadınlarda %35,8; erkeklerde %22,9 olarak bildirilmiştir [16]. Sürekli olarak artan bu oran, obezitenin ve sonuçlarının önlenmesinin önemini vurgulamaktadır.

Pozitif enerji dengesi ile vücut ağırlığında bir artış ile ortaya çıkan obezite prevalansının dünya genelinde artışı büyük bir endişe yaratmaktadır [17]. Obezitenin altında yatan sebepler ise çevresel faktörler, genetik yatkınlık, yaş, cinsiyet, eğitim düzeyi, hormonal faktörler, beslenme alışkanlığı, insan davranışı ve yaşam tarzı arasındaki çok yönlü etkileşim olarak bilinmektedir [17, 18]. Özellikle, endüstrileşme ve modern şehir yaşamından kaynaklanan fiziksel aktivite düzeyinin azalması; kolay ulaşılabilir, kalori ve doymuş yağ asidi yönünden zengin, lif ve vitamin mineral yönünden fakir, ucuz ve pratik olan hazır gıdaların tüketimi, hızlı ve ayaküstü beslenme alışkanlığı; televizyon, bilgisayar ve masa başında vakit geçirme süresinin artması obezite prevalansındaki artışa sebep olarak gösterilmektedir [19, 20].

Çeşitli metabolik hastalıklara sebep olabilen obezite, kronik dönemde fazla enerjinin depolanabilmesi için yağ dokusundaki olgun yağ hücrelerinin lipid içeriğinin artışı yolu ile genişlemesi (hipertrofi) ve stromal fraksiyondaki preadipositlerin diferansiyasyonu yolu ile yağ dokudaki matür adiposit sayısının artması (hiperplazi) ile gelişmektedir (Şekil 2.1.) [21]. Adipoz doku, hiperplazi ve hipertrofi mekanizmaları ile enerji yoksunluğu ve enerji fazlalığındaki değişikliklere dinamik bir şekilde yanıt vererek vücudun enerji homeostazını düzenleyebilmektedir [22]. Hipertrofi ve hiperplazi, adipoz dokudan salgılanan hormon ve sitokinlerin seviyelerinde anormal bir artışa sebep olup birçok patolojik bozukluğa yol açabilmektedir [23].



Şekil 2.1. Adiposit hipertrofi ve hiperplazisi [24]

Obezite; tip 2 diyabet, birçok kanser türü, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon ve osteoartrit gibi birçok kronik hastalığın doğrudan sebebi olabilmektedir ya da ortaya çıkmasını olumsuz yönde etkileyebilmektedir [25]. Örneğin insan vücudundaki her 10 kilogramlık vücut ağırlığı artışı, hipertansiyon riskini %20 arttırmaktadır ve sebebi bilinmeyen hipertansiyonun %70'ine obezitenin sebep olduğu düşünülmektedir [26]. Obezitenin ilişkili olduğu gösterilen çeşitli patolojik bozukluklar yaşam süresini ve yaşam kalitesini düşürmektedir [27]. Obezitenin kolon, rektum, meme, rahim, böbrek, safra kesesi ve pankreas kanserlerinin de içinde olduğu farklı kanser türlerinin görülme riskini artırdığı gösterilmiştir [28-33]. Ayrıca obezite, prostat kanserinin agresifliğini ve nüks etme olasılığını arttırmaktadır [25]. Yapılan çalışmalar, kilo kaybı ile birlikte kanser riskinin azaldığını göstermiştir [34, 35].

Fazla kilo ve obezite, sağlık sorunlarına ek olarak devletler için ekonomik yükün önde gelen nedenlerinden sayılmaktadır [36]. Sağlık maliyetlerinin %10'unun, obezitenin doğrudan ya da dolaylı etkilerinin sonucu olduğu düşünülmektedir [37]. 2014 yılında obezitenin ekonomik yükünün 2 trilyon ABD doları olduğu tahmin edilmektedir [37]. Sağlık harcamalarının yanı sıra obezite aynı zamanda iş gücü kaybı, ölüm ve sakatlıklar sonucunda üretkenlik kaybına sebep

olmaktadır [37, 38]. Bu bilgilerin ışığında fazla kilo ve obezite, ilişkili olduğu hastalıklar ve yol açtığı çeşitli komplikasyonlar nedeni ile bireylerin sağlığı ve yaşam kalitesi üzerine olumsuz etkiler ortaya koymasının yanı sıra, dünya genelinde ekonomik açıdan oldukça büyük bir yük oluşturmaktadır. Bu nedenle altta yatan mekanizmaların daha iyi bir şekilde açıklığa kavuşturulabilmesi ve bu yolla obezitenin tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar geliştirilmesinin önem taşıdığı açıktır.

2.2 Adipoz Doku

Adipoz doku, mezenkimal kök hücrelerin adipositlere diferansiyasyonu sonucunda oluşan, enerji dengesi ve metabolik homeostazı düzenleyebilen çok sayıda maddeyi salgılayan bir endokrin organ olarak bilinmektedir [39]. İnsan vücudunun derialtında ve iç organlarına ait depolarında bulunan adipoz doku, sağlıklı erişkinlerde toplam vücut ağırlığının %10 ila %20'sini oluşturmaktadır [40]. Bu oranların kadınlarda %35'i, erkeklerde ise %25'i geçmesi obeziteyi işaret etmektedir [41].

2.2.1. Adipoz Dokunun Temel Fonksiyonları

- i. Alınan enerjinin trigliseridler halinde depolanmasını sağlamaktadır [42]. Bu depolama insülin, katekolaminler [43] ve glukagon [44] gibi çeşitli hormonlar tarafından düzenlenebilmektedir. Bu hormonlar, vücudun enerji gereksinimine bağlı olarak lipogenezi ya da lipolizi uyarabilmektedir.
- ii. Adipokinler olarak bilinen biyolojik olarak aktif faktörleri salgılayarak endokrin ve metabolik rolleri üstlenmektedir [45].
- iii. Birçok organın etrafını sararak koruma görevi üstlenmektedir [46].
- iv. Soğuğa maruziyette ısı üreterek vücudun ısı dengesini korumaktadır [47].

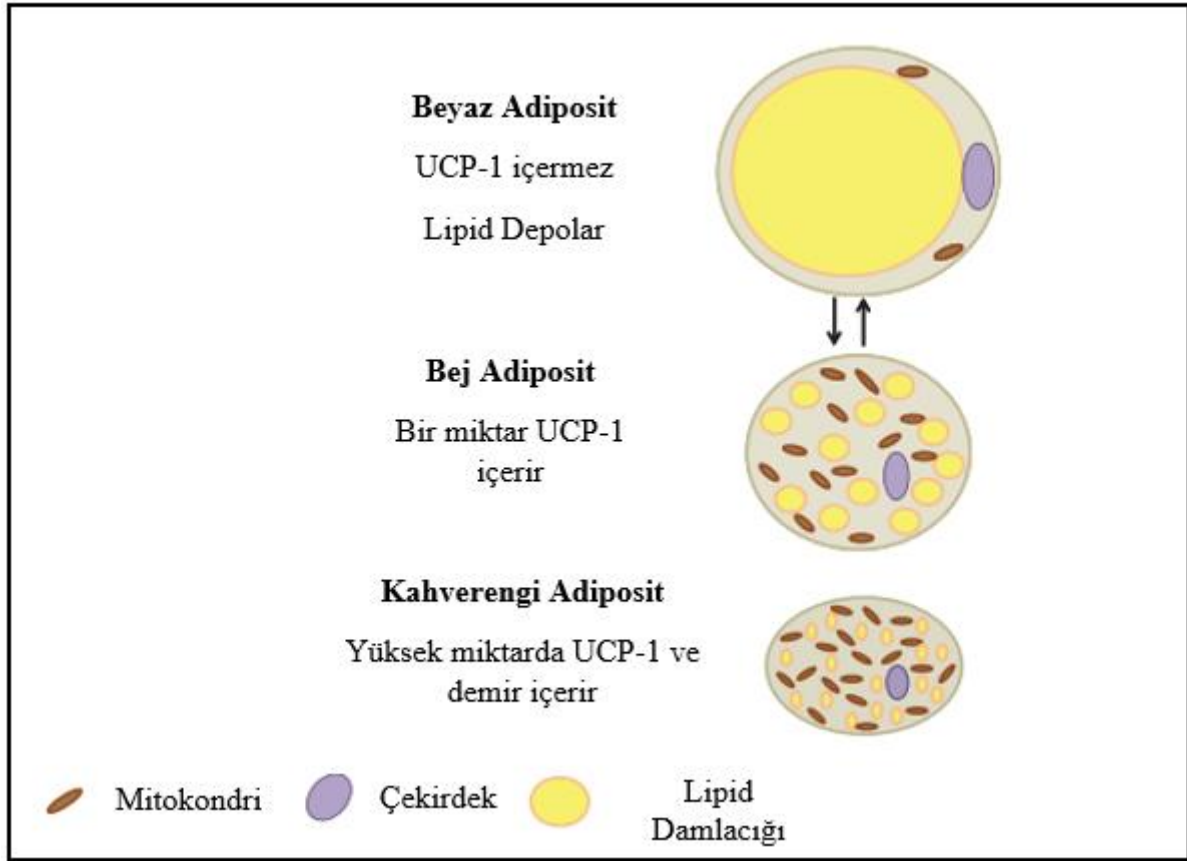
2.2.2. Adipoz Dokunun Sınıflandırılması ve İşlevi

Daha önce yalnızca enerji depolamakla görevli bir doku olarak kabul edilen adipoz doku, temel olarak doku rengine göre ayırt edilebilen kahverengi yağ dokusu, beyaz yağ dokusu ve bej yağ dokusu olmak üzere üç tipte sınıflandırılmıştır. Bunları oluşturan kahverengi, beyaz ve bej adiposit hücreleri, önemli fizyolojik farklılıklar sergilemektedir. Beyaz yağ doku enerji depolama, insülin hassasiyeti ve endokrin fonksiyonlar açısından kritik önem taşımaktadır ve insan dahil

çoğu memelide adipoz dokunun büyük kısmını oluşturmaktadır [48]. Kahverengi yağ doku ise, vücut ısını korumak için ısı üretiminde önemli rol oynamaktadır [48].

Kahverengi, beyaz ve bej adipositler morfolojik ve işlevleri açısından farklılık göstermektedir (Şekil 2.2). Kahverengi adipositler elips biçimindedir; demir [49] ve ısı dengesinin korunmasını sağlayan kenetsizlenme proteini-1 (uncoupling protein-1, UCP-1) bulunduran mitokondriler [50] ve hücre boyunca dağılmış çok sayıda lipid damlacığı içermektedir. Ek olarak, yüksek vaskülarizasyon, küçük yağ dolu vakuoller ve mitokondriden oluşan sitoplazma sebebiyle açık pembe ile koyu kırmızı arası tonlarda görünmektedir [51]. Bir "termal cekete" benzetilen kahverengi yağ dokusu, interskapular, subskapular, aksiller, perirenal ve periaortik bölgelerde bulunmaktadır [52]. Özellikle bebeklerde baskın olarak bulunan kahverengi yağ dokusu kitlesi, yaşla birlikte beyaz yağ dokuya dönüşerek azalmaktadır [53]. Ek olarak, çok sayıda demir ve UCP-1 içeriğinden dolayı ısı dengesinin korunması için önemli bir mekanizma olan "adaptif termogenezi" (non-shivering thermogenesis) gerçekleştirmektedir [54]. Yağ dokusunun temel işlevi enerji depolama olmasına rağmen, kahverengi adipositler, soğuğa maruz kalındığında, enerjiyi besin ve enerji depolarından ısıya dönüştürmektedir [51].

Beyaz adipositler küre biçimindedir ve hücre içindeki organelleri hücrenin çevresine iten büyük ve tek bir lipid damlacığı içermektedir [50]. Kahverengi adipositler 15-50 μm 'ye kadar büyüme kapasitesine sahipken; beyaz adipositler 100 μm 'ye kadar büyüebilmektedir [55]. Beyaz adipoz doku lipid depolanmasında, hormon üretiminde, bağışıklık fonksiyonlarında ve lokal doku yapımında rol oynamaktadır [56, 57]. Ek olarak; visceral beyaz adipoz doku ve deri altı beyaz adipoz dokusu olarak sınıflandırılmaktadır. Visceral beyaz adipoz doku, iç organları çevreleyen yağ dokuyu ifade eder; deri altı beyaz adipoz doku ise uyluk ve kalça çevresinde bulunmaktadır [56]. Visceral beyaz adipoz dokunun birikimi ateroskleroz, dislipidemi ve tip 2 diyabetin oluşması açısından risk sayılmaktayken [58]; deri altı beyaz adipoz dokunun birikimi insülin hassasiyetinin artması ile ilişkilendirilmiştir [56].



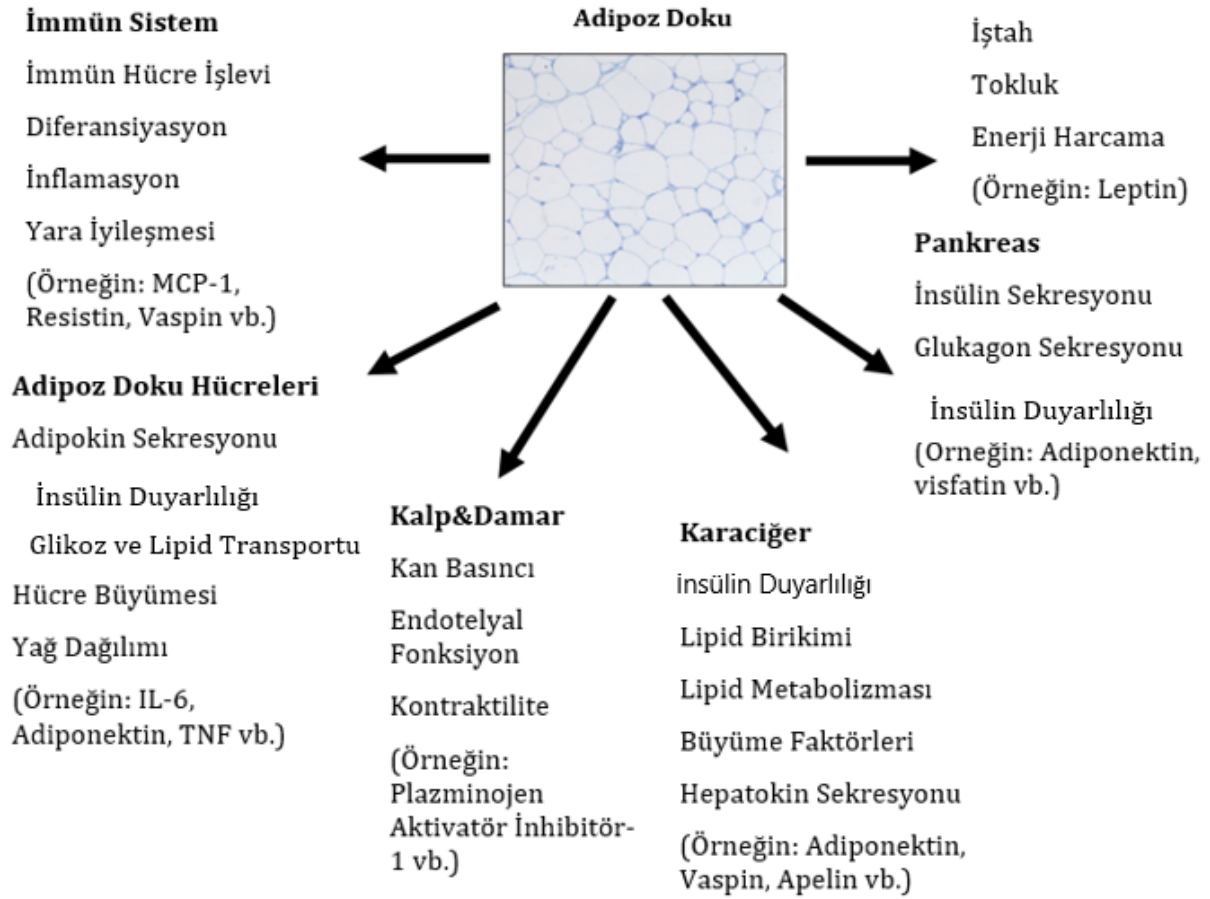
Şekil 2.2. Adiposit hücrelerinin morfolojik farkları [50]

Bej adipositler, kahverengi adipositlere benzer şekilde fakat daha az miktarda UCP-1 içermektedir, mitokondriden zengindir ve termojenik yağ hücresi olarak bilinmektedir [59]. Ayrıca, bej adipositler, kahverengi ve beyaz adipositlerin özelliklerine sahip olmalarına rağmen, derialtında farklı bir preadiposit alt kümesinden kaynaklandıkları düşünülmektedir [59]. Bej adipositler, beyaz adipoz doku depolarında bulunmaktadır. Ancak kahverengi adipoz dokunun bazı morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini paylaşmaktadır [60]. Bunlara ek olarak, bej adipositlerin, kronik olarak soğuğa maruz kalma, $\beta 3$ -adrenerjik reseptör agonistleri etkisiyle ve egzersiz ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. [61]. Bej adipositler, uyarılmadıkları zaman beyaz adipositlere benzer görünen fakat vücut soğuğa maruz kaldığında belirli beyaz adipositlerde ortaya çıkan kahverengi benzeri adipositlerdir [62]. Soğuğa yanıt olarak ortaya çıkan bu durum, “BYD’nun kahverengileşmesi” olarak bilinmektedir.

2.2.3. Adipoz Dokunun Endokrin Fonksiyonu

Adipoz doku, genel olarak, açlık durumunda organizmanın enerji ihtiyacını karşılamak için serbest yağ asitlerinin (Free Fatty Acids, FFA) salıverildiği, tokluk durumunda ise fazla enerjinin depo edildiği bir depo organ olarak bilinmektedir [46]. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise, yağ dokusunun vücuttaki en büyük endokrin organlardan biri olduğunu; çeşitli hormonlar, büyüme faktörü, kemokinler ve adipokinler olarak bilinen çeşitli biyolojik olarak aktif maddeleri ve salınımını düzenleyebilen ve enerji homeostazında önemli rol oynayan aktif bir doku olduğunu göstermiştir [63]. Salgılanan adipokinler enerji ve iştah düzenlenmesi, lipid ve glukoz metabolizması, kan basıncı, endotel hücre fonksiyonu gibi birçok süreçte rol oynamaktadır [64].

Leptin, adiponektin, rezistin, omentin, tümör nekroz faktör (TNF- α), interlökin-6 (IL-6), interlökin-1 β (IL-1 β), monosit kemoatraktan protein-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) ve dönüştürücü büyüme faktörü- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β) başlıca bilinen adipokinlerdir [65]. Obezite ile birlikte adipoz dokunun büyümesi, salgılanan adipokinlerin seviyelerinde dengesizliğe sebep olmaktadır. Bu maddelerin bazıları obezite ile doğru orantılı; bazıları ise ters orantılı olarak bilinmektedir. Örneğin IL-6, IL-1 β , TNF gibi proinflamatuvar maddeler ve leptin gibi iştah kontrolünü düzenleyen maddelerin seviyesi obez bireylerde daha yüksek görülürken; adiponektin, omentin, visfatin gibi adipokinlerin kan düzeylerinin vücut yağ kütlesi ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir [66, 67]. Adipokinlerin seviyelerindeki farklılıklar ise inflamasyon, insülin direnci, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik sendrom riskini arttırmaktadır [66, 68].



Şekil 2.3. Adipokinlerin rol aldığı fizyolojik süreçler [67]

2.3. Adipogenez

Adipositler, preadipositler, immün hücreler, fibroblast, vasküler düz kas hücreleri ve endotelial hücreleri içeren adipoz doku, vücutta bulunan en kompleks organlardan biridir [69, 70, 71]. Adipositlerin organlara fiziksel desteği, endokrin aktivitesi ve enerji dengesi gibi birçok önemli rolü özellikle son 20 yıldır bilinmektedir [72, 73]. Bilindiği üzere, adipositlerin disfonksiyonu obezite, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok patolojide kilit rol oynamaktadır [25]. Bu sebeple, çalışmalarda yeni adipositlerin oluşumu olarak bilinen adipogenez sürecinin mekanizmasına odaklanılmaktadır.

Adipositlerin öncülü olan mezenkimal kök hücreler, ilk olarak yağ hücrelerine, daha sonra preadipositlere ve sonrasında olgun adiposit hücrelerine farklılaşmaktadır [74]. Yani adipogenez süreci, fibroblast benzeri preadiposit hücrelerinin; insüline duyarlı adiposit hücrelerine farklılaşması olarak bilinmektedir. Oldukça karmaşık olan bu süreçte; peroksizom proliferatör ile

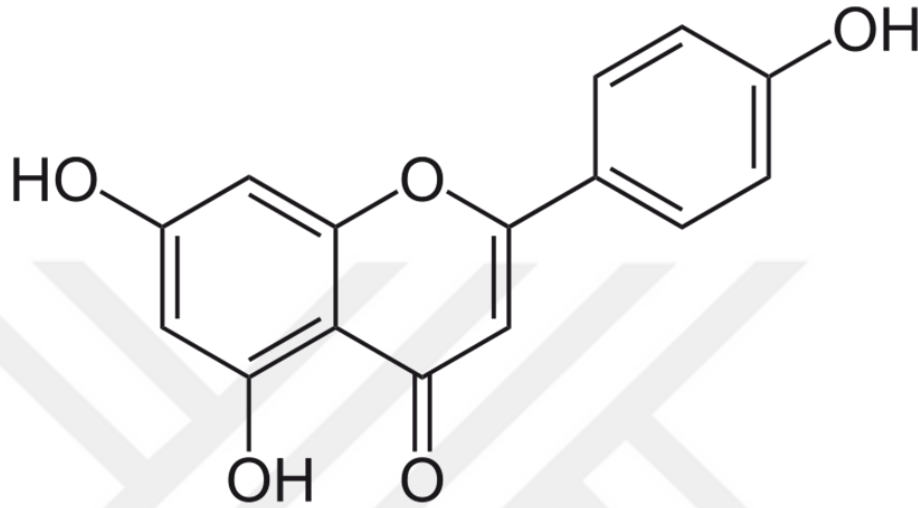
aktive olan reseptör- γ (PPAR- γ), CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein (CCAAT/Enhancer-Binding Protein, C/EBP) ve Krüppel benzeri faktör (Krüppel-Like Factor, KLF) gibi birçok transkripsiyon faktörünün etkili olduğu bilinmektedir [75].

Adipositlerin diferansiyasyon süreci 3 aşamayı içermektedir: (i) adiposit kökenli mezenkimal kök hücrelerin yönlenmesi, (ii) mitotik klonal genişleme, (iii) C/EBP ve PPAR- γ gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu içeren terminal diferansiyasyon [71]. Farklılaşma sürecinde, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (Insulin-Like Growth Factor-1, IGF-1) gibi büyüme faktörleri de etkili olmaktadır [71, 76]. IGF-1; preadipositlerin proliferasyonu, diferansiyasyonu, yaşamsallığını sürdürmesi için önemli role sahiptir; insülin ise adipogenezi indükleyen adipojenik hormonlardan biridir [71, 77, 78].

C/EBP α , C/EBP β ve PPAR- γ başta olmak üzere transkripsiyon faktörleri, birbirlerini aktive ederek ya da baskılayarak adipogenez sürecinde önemli rol oynamaktadır. Adipogenez süreci, C/EBP β protein grubunun aktivasyonu ile başlamaktadır ve bu protein grubunun ekspresyonu diferansiyasyon sürecinin ilk 2 günü (erken evre) boyunca devam etmektedir. C/EBP β protein grubu daha sonra C/EBP α ve PPAR- γ proteinlerinin ekspresyonunu indüklemektedir. C/EBP α ve PPAR- γ proteinlerinin ekspresyonu diferansiyasyon sürecinin erken evresinde başlayıp preadipositlerin olgun adipositlere farklılaşmasına kadar devam etmektedir [77, 78, 79]. Hormonlar, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi etkenler de adiposit diferansiyasyonunu etkilemektedir. İnsülin, IGF-1, glukokortikoidler, tiroid gibi hormonların adipogenezi indüklediği bilinmektedir [76]. Tiroid hormonu (T3), tiroid reseptörü $\alpha 1$ ile indüklenen lipojenik gen ekspresyonu yoluyla adipogenezi aktive etmektedir [80]. Benzer şekilde, adipogenezin pozitif düzenleyicisi olan glukokortikoidler, C/EBP α ve PPAR- γ ekspresyonunu uyarak preadiposit diferansiyasyonunu desteklemektedir [77]. Bunların aksine, hücre büyümesi ve hücre yaşamında etkili olan Wnt sinyal yolağının, adipogenezin negatif düzenleyicisi olduğu bilinmektedir [81]. Bununla birlikte, oldukça karmaşık ve çok aşamalı bir süreç olan adipogenez hakkında açığa çıkarılmayı bekleyen pek çok nokta bulunmaktadır. Bunlar göz önüne alındığında, diferansiyasyon sürecini oluşturan bu adımların üzerinde çalışmalar yapılması, obezite üzerinde etkili yeni yaklaşımlar gelişmesini sağlayacaktır.

2.4. Apigenin

Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon) papatya, portakal, greyfurt, kereviz ve maydanoz gibi çok sayıda bitki, sebze ve meyvelerde bulunan, flavon alt sınıfına ait bir flavonoiddir. [82].



Şekil 2.4. Apigeninin kimyasal yapısı [83]

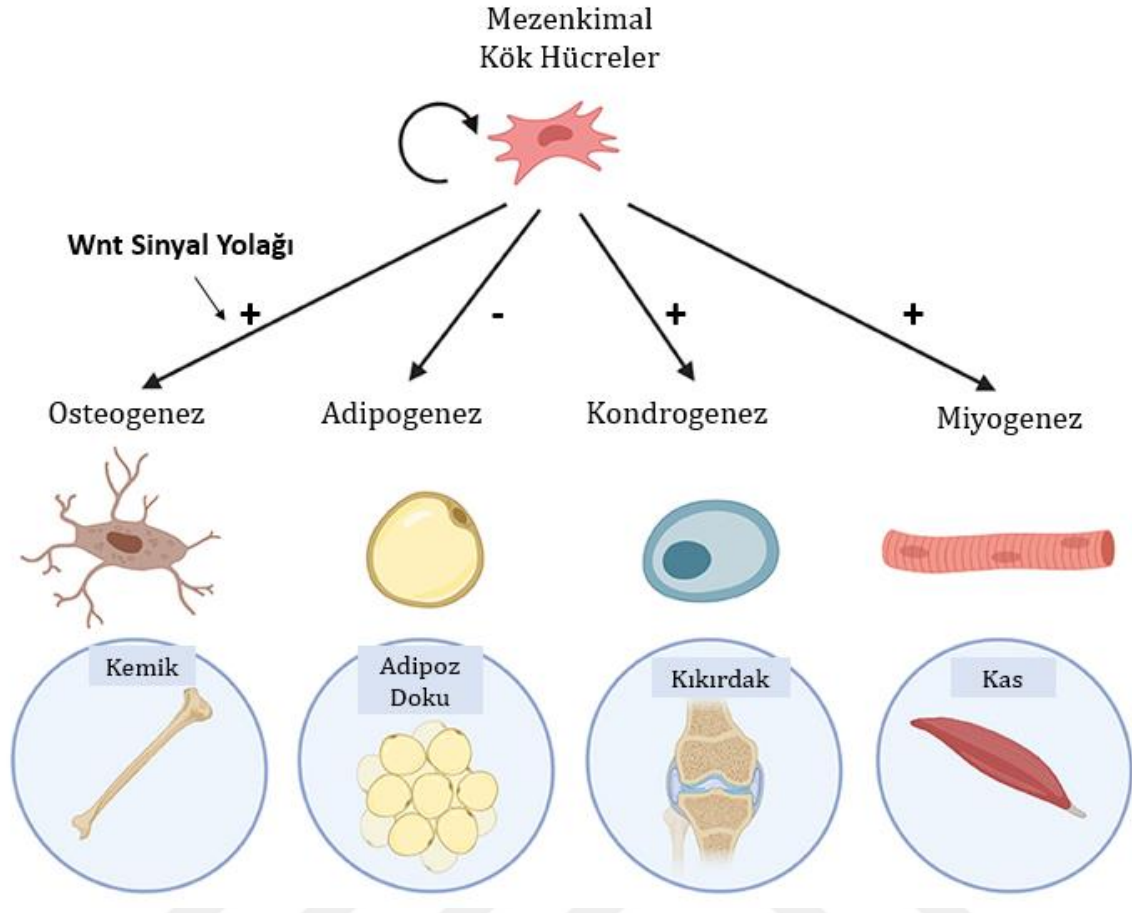
Apigenin, tümör büyümesini inhibe edici potansiyeli ile bilinen doğal bir bileşik olarak birçok kanser hücre hattında araştırılmıştır [83-85]. Potansiyel antikanser rolüne ek olarak, apigeninin antiinflamatuvar özellikleri de tanımlanmıştır [86]. Ayrıca, çeşitli çalışmalarda apigeninin, ateroskleroz, hipertansiyon gibi nedenlere bağlı olarak gelişen kardiyovasküler hastalıklarda, solunum sistemi, endokrin sistem, sinir sistemi ve kas iskelet sisteminde koruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir [82].

Antikanser, antiinflamatuvar ve antioksidan olarak bilinen ve insan diyetinde yer alan bazı doğal ürünlerin adipogenezi baskıladığı bilinmektedir [87]. Bu ürünlerden biri olan apigenin antioksidan, antikanser ve antiinflamatuvar özelliklerine ek olarak, adipogenezi baskılayarak antiadipojenik özellik de göstermiştir [88]. Bu etkinin diferansiyasyon sürecinin hangi aşamalarında gerçekleştiği ve düzenleyici mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.5. WNT Sinyal Yolağı

Wnt sinyal yolağı, hücre bölünmesi, proliferasyonu, farklılaşması ve hücre sağ kalımı gibi hücresel fonksiyonlarda rol alan bir protein ailesidir [89]. Wnt sinyal yolağı üç kategoride incelenmektedir: kanonik Wnt (β -katenin bağımlı), kanonik olmayan düzlemsel hücre polarite sinyal yolu. ve kanonik olmayan Wnt/kalsiyum sinyal yolu. Bunlardan kanonik Wnt sinyal yolu daha yaygın olarak çalışılıp aydınlatılmıştır [90]. Wnt sinyal yolağının, mezenkimal kök hücrelerin kas ve kemiklere farklılaşmasını desteklerken; adipositlere farklılaşmasını inhibe ettiği bildirilmiştir [14,15].

Mezenkimal kök hücreler, çeşitli hücre tiplerine farklılaşma özelliğine sahip pluripotent hücrelerdir. Hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve yaşamsallığı dahil olmak üzere birçok süreçte rol oynayan Wnt sinyal yolağının, mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma aşamasında etkili olduğu bildirilmiştir. Wnt sinyal yolağının aktivasyonu, C/EBP α ve PPAR γ ekspresyonunu baskılamakta ve bunun sonucunda adipojenik farklılaşma baskılanmaktadır [91]. Buna göre, preadipositlerin adipositlere farklılaşması için Wnt sinyalinin baskılanması gerekmektedir. Hücre proliferasyonundaki rolü ise tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda, Wnt sinyali aktif durumdayken mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunun baskılandığı bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda ise Wnt sinyali aktifken hücre proliferasyonunun desteklendiği gözlenmiştir [92-94]. Bu bağlamda, Wnt sinyal yolağının, farklı hücre tiplerinde proliferasyon üzerine farklı etkileri gözlenmiştir.



Şekil 2.4. Mezenkimal kök hücrelerin kemiğe (osteogenez), yağ dokusuna (adipogenez), kıkırdak (kondrogenez) ve kaslara (miyogenez) farklılaşma potansiyeli [14]

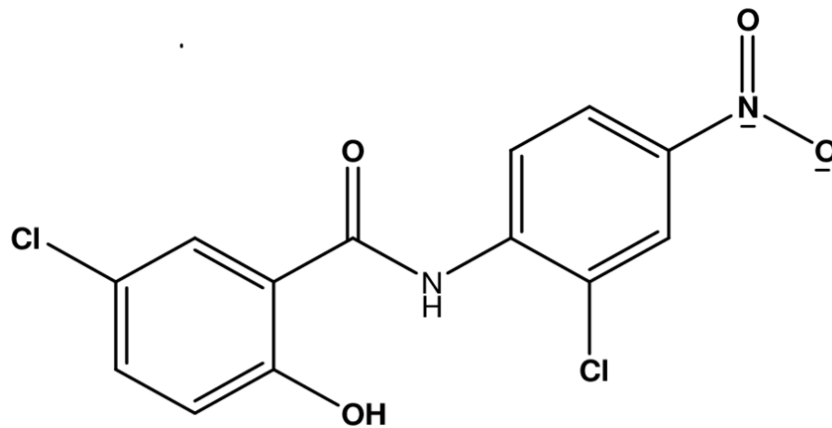
Wnt proteini, hedef hücrelerde bulunan Frizzled (Fz) ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein 5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 , LRP 5/6) yardımcı reseptörlerine bağlanır. Wnt proteininin hücre içi alt efektörleri ise β -katenin, Disheveled (Dsh), Kazein kinaz-1 (Casein Kinaz-1, CK-1), Axin, Protein Fosfatase 2A (Protein Phosphatase 2A, PP2A), Glikojen Sentaz Kinaz 3- β (Glycogen Synthase Kinase-3 β , GSK3- β) enzimi, Adenomatöz Polipozis Koli (Adenomatous Polyposis Coli, APC) proteinidir. T-hücre faktörü (T-cell Factor, TCF) ve Lenfoid Güçlendirici-Bağlayıcı Faktör (Lymphoid Enhancer-binding factor, LEF) ise hücresel yanıt oluşumunda rol oynayan transkripsiyon faktörleridir [87, 95, 96].

Wnt sinyal yolağı inaktif durumdayken Fz ve LRP 5/6 koreseptörleri de inaktif durumdadır. Ek olarak, Axin, APC, GSK-3 β , CK-1 ve PP2A 'nın bulunduğu β -katenin yıkım kompleksi, β -katenini bağlayıp fosforile ederek β -kateninin degradasyonuna sebep olur. Wnt sinyali aktif durumdayken ise, Wnt proteini Fz reseptörü ve LRP 5/6 koreseptörüne bağlanır. Ardından LRP 5/6 koreseptörü CK-1 ve GSK-3 β tarafından fosforile edilir ve böylece yıkım kompleksi bozulmuş olur. Sonuç olarak sitoplazmada biriken β -katenin nükleusa geçerek orada

TCF ve LEF ile bir kompleks oluşturur ve bu olay Wnt sinyaline yanıt veren genlerin aktivasyonu ile sonuçlanır [97-99].

Kanser hücrelerinde yaygın olarak çalışılan apigeninin, anti-tümör etkinlik gösterdiği birçok çalışmada gözlenmiştir. Kanser hücre hattında apigenin, bu işlevini Wnt genlerinin ekspresyonunu inhibe ederek gerçekleştirmiştir [100, 101]. Farklı bir çalışmada ise apigenin, mezenkimal kök hücrelerde, Wnt sinyalinin bazı hedef genlerinin ekspresyonunu arttırarak Wnt/B-katenin sinyal yolağını aktive ettiği, mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını desteklediği bildirilmiştir [102]. Kısacası apigenin, farklı hücre hatlarında farklı etkiler göstermiştir. Yapılan çalışmalarda kullanılan maddeler genellikle diferansiyasyon sürecini içermektedir fakat maddelerin etki mekanizmasının iyi anlaşılabilmesi için proliferasyon üzerindeki etkilerinin de bilinmesi gerekmektedir. Literatürde kullanılan çeşitli maddelerin 3T3-L1 preadiposit proliferasyonu üzerindeki etkisini içeren az sayıda çalışma vardır. Aynı şekilde Wnt sinyal yolağının adiposit hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisi de tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmamızda, 3T3-L1 preadipositlerinin viabilitesi ve migrasyonu üzerinde, diferansiyasyon sürecinde ve proliferasyon aşamasında, farklı zamanlarda ve farklı konsantrasyonlarda apigenin uygulanmasının etkisinin araştırılması ve bu olası etkiye Wnt sinyal yolağının olası katkısının araştırılması planlanmıştır. Çalışmada Wnt sinyal yolağı inhibitörü olarak niklozamid kullanılmıştır.



Şekil 2.5. Niklozamidin kimyasal yapısı [103]

3. MATERYAL ve METOD

3.1. 3T3-L1 Preadiposit Hücre Kültürü

3T3-L1 preadiposit hücre hatları, preadipositlerin olgun adipositlere farklılaşmasını incelemek için uygun bir modeldir ve bu sebeple obezite ve obeziteye bağlı metabolik hastalıkların çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Adherent özelliğe sahip olan bu hücreler, kültür kabının taban kısmına tutunup orada bir tabaka oluştururlar. Bu tabaka monolayer (tek tabaka) olmalıdır. Hücreler konflue olduğu halde pasajlanmaz ise birbirleri ile teması artacağından monolayer durumdan polilayer duruma geçerler. Bu durumda hücreler tabandan ayrılır ve homojen bir yayılım göstermezler. 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonunun değerlendirildiği çalışmalarda yaygın olarak kullanılan diferansiyasyon protokolüne göre, ekimi yapılan 3T3-L1 preadipositlerinin tam konfluent oldukları gün diferansiyasyon protokolünün 2'nci günü olarak kabul edilir. Hücreler BCS (Bovine Calf Serum, sığır buzağı serumu) içeren medyumda 2 gün daha bekletilir ve postkonfluent 2'nci gün diferansiyasyon protokolünün 0. günü olarak kabul edilir. Protokolün 0-2'nci gün aralığında, diferansiyasyonu indüklemek amacı ile hücrelere %10 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren farklılaştırma kokteyli (0,25 µM deksametazon, 0,5 mM izobütilmetilksantin (IBMX) 1µM insülin) uygulanır. Protokolün 2-4'üncü gün aralığında ise hücrelere 1µM insülin ve %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Fetal Sığır Serumu) içeren medyum uygulanır. Daha sonra, protokolün 4-8'inci günü aralığında, hücrelere %10 FBS içeren komplete medyum günasırı değişimi yapılarak uygulanır. Farklılaştırma kokteyli uygulamasından yaklaşık 4 gün sonra hücrelerde lipid damlacıkları birikmeye başlar ve diferansiyasyonun 8'inci gününde olgun adipositler oluşur [103, 104]. Protokolün 8'inci gününde deney sonlandırılarak adiposit diferansiyasyonu değerlendirilir.

Laboratuvarda -80°C derin dondurucuda 1 ml'lik vial içerisinde bulunan 3T3-L1 preadiposit hücreleri buz aküleri ile uygun koşullar altında laboratuvara getirildi. 37°C sıcak su banyosunda hızlıca çözündürüldü ve 15 ml'lik falkon tüp içerisine aktarıldı. Üzeri daha önce hazırlanan komplete medyum [%10 BCS, %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 L-Glutamin bulunan Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum (DMEM)] ile 15 ml'ye tamamlandı ve 37°C sıcaklıkta 1800 rpm (Revolutions per Minute, Dakikadaki Devir Sayısı)'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücre pelletinin üzeri komplete medyum ile 5 ml'ye tamamlandı. Hücre ve medyum karışımının homojen olması için pipetaj yapıldı ve 25 ml hacmindeki flasklara ekildi. Ekilen hücrelerin üzerine 3 ml komplete medyum eklendi.

Çözdürülmesi ve pasajlanması tamamlanan hücrelerin bulunduğu flasklar, %5 CO₂ konsantrasyona ve 37°C ortam sıcaklığına sahip inkübatöre filtreli kapakları inkübatörün iç kısmına bakacak şekilde kaldırıldı. Flaskların içerisindeki medyum gün aşırı değiştirildi.

3.2. Hücre Pasajlama

Hücreler tam olarak konflue olduğunda büyüme durması evresine geçilmemesi için pasajlama işlemi yapıldı. Flask içerisindeki medyum uzaklaştırıldı. Medyum kalıntılarının temizlenmesi için serum, penisilin-streptomisin ve glutamin içermeyen DMEM ile yıkama işlemi yapıldı. Ardından flaskların içerisine 2 ml tripsin eklendi. Flasklar 5 dakika boyunca hafifçe hareket ettirilip titreşim uygulanarak hücrelerin tutundukları yüzeyden kaldırılması sağlandı. Sürenin bitiminde inverted mikroskopta hücrelerin yerlerinden kalkıp kalkmadıkları değerlendirildi. Hücrelerin tümüyle zeminden ayrıldıkları flaskların içerisindeki hücre solüsyonu birkaç kez pipetaj yapılarak alınıp 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Falkon tüpteki hücre solüsyonunun üzeri 15 ml'ye serum, penisilin-streptomisin ve L-glutamin içermeyen DMEM ile tamamlandıktan sonra 37°C sıcaklıkta 1800 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücre pelletinin üzeri 7,5 ml'ye tamamlanarak 1:3 oranında pasaj yapıldı. Flasklardaki hücrelerin medyumları gün aşırı değiştirildi. Hücrelerin yoğunluğu %100 oranına ulaştığında tripsinizasyon işlemi tekrarlanarak pasajlama işlemi tekrarlandı. Gerçekleştirilecek deney serileri için yeterli miktarda hücre deney serilerinde kullanıldı. Bu aşamada deneylerde kullanılmayan hücrelerin bir kısmı sonraki deneylerde kullanılmak üzere dondurularak Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan -80°C derin dondurucuya kaldırılarak saklandı.

3.3. Hücre Sayımı

Deney serilerinde kullanılacak pleytlerdeki kuyucuklara eşit sayıda hücre ekilebilmesi için hücre sayımı yapıldı. Hücre sayımı, tripan mavisini kullanılarak thoma lamında yapıldı. Flasklardaki hücrelerin tutundukları zeminden kaldırılması için tripsinizasyon işlemi yapıldı. Sonrasında hücreler 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı ve serum, glutamin ve penisilin-streptomisin içermeyen DMEM ile üzerleri 15 ml'ye tamamlandı. Ardından 37°C sıcaklıkta 1800 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan hücre pelletinin üzeri %10 BCS içeren komplete medyum ile tamamlandı. Bu aşamada tüpe hafif hafif fiske atılarak tüpün çeperine yapışık vaziyette bulunan hücre pelletinin ayrılması sağlandı. Ardından birkaç kez pipetaj yapılarak hücrelerin homojen şekilde dağılması sağlandı. Bir ependorf tüp içerisine hücre solüsyonundan 10 µl ve tripan mavisinden 10 µl alındı, pipetaj

yapılıp karıştırıldı. Tripan mavisi ve hücre karışımından thoma lamı üzerindeki iki alana 10 µl verildi. Thoma lamı üzerindeki her iki alan da mikroskop altında incelenip canlı hücrelerin sayımı yapıldı.

3.4. Apigenin ve Niklozamid Çözeltilerinin Hazırlanması

Apigenin ve niklozamid (Sigma-Aldrich) üreticinin talimatlarına uygun olarak hazırlandı. Öncelikle DMSO (Dimetilsülfoksit) içerisinde çözündürülerek apigenin (40 µM) ve niklozamid (10 µM) stok solüsyon hazırlandı. Daha sonra deney serilerinde kullanılacak olan konsantrasyonlardaki solüsyonlar (2,5, 5 ve 10 µM apigenin; 0,25 µM niklozamid) stok çözeltiden DMSO ile seyreltilerek hazırlandı. Hazırlanan solüsyonlar 1,5 ml hacmindeki ependorf tüplere alınarak -20°C'de muhafaza edilmek üzere kaldırıldı.

3.5. MTT Çalışma Solüsyonu ve Çözücü Solüsyonların Hazırlanışı

Proliferasyon ve viabilite deneylerinden bir gün önce 5 mg MTT tartılarak falkon tüp içerisine alındı ve üzerine PBS (Phosphate buffered saline, fosfat tamponlu salin solüsyon çözeltisi) eklenerek çözündürüldü. İşlem sırasında MTT'nin ışıktan korunması için azami dikkat gösterildi. Çözelti 0,2 µm'lik filtreden geçirildi. Falkon tüpün dış kısmı alüminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunması sağlandı. Bu şekilde hazırlanan MTT stok solüsyonu +4°C ortam sıcaklığında saklandı. Deneyler sırasında MTT uygulanmasını takiben hücrelerin içerisinde oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için kullanılacak olan çözücü solüsyon için öncelikle %37 HCl'den 16,7 ml alındı ve pH 2 olan steril su ile 100 ml hacme tamamlandı. Sonrasında bu karışımdan 2 ml alınıp üzeri izopropanol ile 100 ml hacme tamamlandı. Deney günü hazırlanmış olan MTT stok çözeltisinden çalışma çözeltisi (final konsantrasyonu 0,5 mg/ml) hazırlanıp kullanıldı.

3.6. MTT Analizi

Hem hücre viabilitesinin hem de preadipositlerin proliferasyonunun değerlendirilmesi MTT analizi ile gerçekleştirildi. Bu amaçla deney serisi için planlanan zaman noktalarında deneyler sonlandırılarak MTT analizi yapıldı. Hücrelerin bulunduğu 24 kuyucuklu pleytler inkübatörden çıkarıldı. Kuyucuklardaki medyum dikkatlice uzaklaştırıldı. Ardından kuyucuklarda kalan medyumun tamamen uzaklaştırılması için PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra

kuyucuklara, 37°C'ye getirilmiş MTT çalışma solüsyonundan verildi. Bu aşamada pleytler alüminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunmaları sağlandı. Pleytler inkübatörde 37°C'de 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki MTT solüsyonu çekilip atıldı. Formazan kristallerini çözdürmek için kuyucuklara asidifiye izopropil alkol eklenerek 10 dakika boyunca orbital çalkalayıcıda çalkalama işlemi yapıldı. İşlem bitiminde her kuyucuktan 150 µl alınarak 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine aktarıldı. Solüsyon kuyucuklardan alındığı sırada her kuyucukta birkaç kez pipetaj yapılarak formazan kristallerinin tamamıyla çözünmesi sağlandı ve aktarım yapıldı. ELISA okuyucusunda 570 nm absorbansta okuma yapıldı.

3.7. Viabilite Deney Serisi

Hücre canlılığının değerlendirilmesi amacı ile 24, 48 ve 72 saatlik viabilite deney serileri planlandı ve analizi MTT değerlendirmesi ile yapıldı. Hücre sayımının ardından 24'lük pleytlere her kuyucuğa 50.000 hücre olacak şekilde komplete medyum (%10 BCS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM) ile ekim yapıldı. Hücrelerin %100 oranında konflue olması beklendi. Hücreler beklenen yoğunluğa ulaştıktan sonra kuyucuklara apigenin (2,5, 5 ve 10 µM), niklozamid (0,25 µM) ve kontrol grubuna aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulandı. Ön deneyler sırasında niklozamid 0,5 µM uygulanmıştı fakat hücre canlılığında bir azalmaya sebep olmuştu, bu yüzden niklozamid 0,25 µM konsantrasyonunda uygulanmıştır.

Deney serileri:

- DMSO Kontrol Grubu (n=4)
- 2,5 µM Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 5 µM Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 10 µM Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 0,25 µM Niklozamid uygulanan grup (n=4)

İlaç uygulamasından sonra 24, 48 ve 72 saat olmak üzere 3 grup olarak planlanan sürelerin sonunda deney durduruldu ve MTT analizi yapıldı.

3.8. Proliferasyon Deney Serisi

Apigeninin, niklozamid varlığında ya da yokluğunda hücre proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile proliferasyon deney serisi gerçekleştirildi. Bu amaçla 3T3-L1 preadipositlerinin proliferasyon sürecinin 0-2, 2-4 ve 0-4'üncü günleri niklozamid (0,25 µM) varlığında ya da yokluğunda hücre kültür ortamına apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulandı ve

proliferasyon sürecinin dördüncü günü deneyler sonlandırılarak MTT analizi yapıldı. Deney serisinin ilk günü flasklardaki hücreler tripsinize edilerek santrifüj edildi. Ardından Hücre sayımı yapılarak 24'lük pleytlere her kuyucukta 50.000 hücre olacak şekilde komplete medyum (%10 BCS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM) ile ekim yapıldı. Gün aşırı medyum değişimi yapılarak hücrelerin tam konfluent olması beklendi. Hücrelerin beklenen yoğunluğa ulaştığı gün -2'nci gün olarak kabul edildi. Hücreler komplete medyumda (%10 BCS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM) 2 gün daha bekletildi. Postkonfluent 2'nci gün proliferasyon sürecinin 0'nci günü olarak kabul edildi. Bu aşamada kuyucuklara diferansiyasyon indükleyici kokteyl [0,5 µM IBMX, 0,25 µM deksametazon ve 1 µM insülin] içeren %10 FBS ile hazırlanmış komplete medyum (%10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM) uygulandı. Deneylerde hücrelere önceden belirlenen zaman aralıklarında (0-2, 2-4 ve 0-4'üncü gün) niklozamid varlığında ya da yokluğunda apigenin uygulandı. Kontrol gruplarına ise aynı hacimde DMSO kontrol çözeltisi uygulandı ve 4'üncü günün sonunda deney sonlandırılarak MTT analizi yapıldı.

Deney serileri:

- DMSO Kontrol Grubu (n=4)
- 2,5 µM Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 5 µM Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 10 µM Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 0,25 µM Niklozamid uygulanan grup (n=4)
- 2,5 µM Apigenin + 0,25 µM Niklozamid (n=4)
- 5 µM Apigenin + 0,25 µM Niklozamid (n=4)
- 10 µM Apigenin + 0,25 µM Niklozamid (n=4)

3.9. Diferansiyasyon Deney Serisi

Apigeninin 3T3-L1 hücrelerinin diferansiyasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile diferansiyasyon deney serileri gerçekleştirildi. Bu amaçla belirlenmiş zaman aralıklarında (0-4, 4-8 ve 0-8'inci gün) hücre kültür ortamında niklozamid (0,25 µM) varlığında ya da yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulaması yapıldı ve diferansiyasyon sürecinin bitiminde deneyler sonlandırılarak Oil Red O boyama yöntemi ile analiz edildi. Deney serisinin ilk günü hücre sayımının ardından 24'lük pleytlere her kuyucukta 50.000 hücre olacak şekilde komplete medyum (%10 BCS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM) ile ekim yapıldı. Hücrelerin tam konflue olması beklendi. Hücrelerin tam konfluent olduğu gün diferansiyasyon

protokolünün-2'nci günü olarak kabul edildi. Hücreler komplete medyumda (%10 BCS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM) 2 gün daha bekletildi. Post konfluent 2'nci gün diferansiyasyon protokolünün 0'nci. günü olarak kabul edildi ve diferansiyasyonu indüklemek amacı ile hücrelere diferansiyasyon kokteyli (0,5 μ M IBMX, 0,25 μ M deksametazon ve 1 μ M insülin) ve %10 FBS içeren komplete medyum uygulandı. Diferansiyasyon protokolünün 2'nci günü medyum değişimi yapılarak hücrelere 1 μ M insülin ve %10 FBS içeren komplete medyum uygulandı. Protokolün 4'üncü günü kuyucuklara %10 FBS içeren komplete medyum uygulandı. Hücrelerin güneşirı medyumunu değıştirilerek 8'nci güne kadar inkübe edildi. 0-4, 4-8 ve 0-8'nci gün aralığında kuyucuklara niklozamid varlığında ve yokluğunda apigenin uygulandı. Kontrol gruplarına ise aynı hacimde DMSO kontrol çözeltisi uygulandı.

Deney serileri:

- DMSO Kontrol Grubu (n=4)
- 2,5 μ M Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 5 μ M Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 10 μ M Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 0,25 μ M Niklozamid uygulanan grup (n=4)
- 2,5 μ M Apigenin + 0,25 μ M Niklozamid (n=4)
- 5 μ M Apigenin + 0,25 μ M Niklozamid (n=4)
- 10 μ M Apigenin + 0,25 μ M Niklozamid (n=4)

0-4, 4-8 ve 0-8'inci günler aralığında ilaç uygulandı ve sürelerin sonunda deney durdurularak Oil Red O boyama işlemi yapıldı.

3.9.1. Oil Red O Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

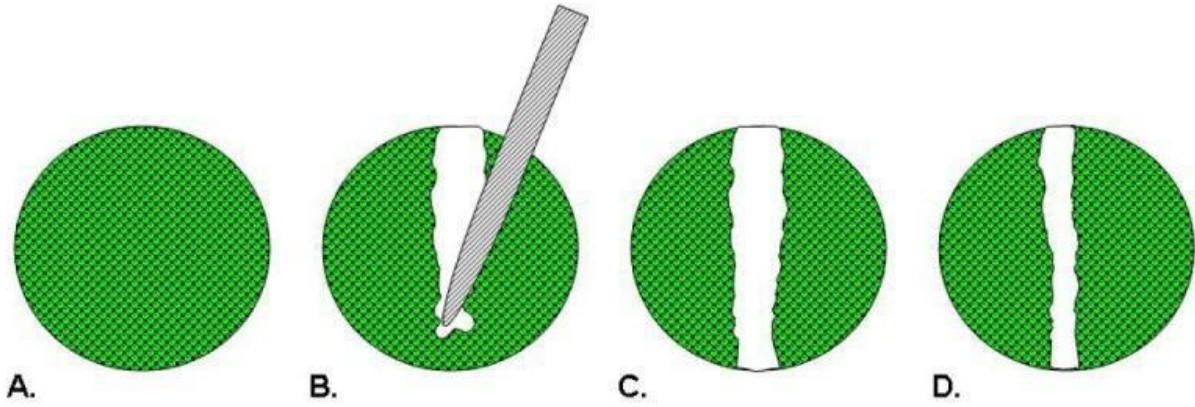
100 ml izopropanol 50 ml'lik falkon tüp içersine alındı. Üzerine 0,35 g olarak tartılan Oil Red O boyası eklendi ve iyice çözdürüldü. Hazırlanan solüsyon 0,22 μ m membran filtre ile filtreden geçirildi. Oil Red O stok solüsyonunun hazırlanması sırasında ışıktan etkilenmemesine azami dikkat gösterildi. Işıktan koruma amacı ile tüpün dış kısmı alüminyum folyo ile kaplandı ve solüsyon +4°C'de 1 gece bekletildi. Ertesi gün 0,22 μ m membran filtre ile solüsyon filtreden geçirildi. Hazırlanan stok solüsyon +4°C sıcaklıkta ışıktan korunarak saklandı. Deney serisinde kullanılacağı zaman,2 birim Oil Red O stok solüsyon 4 birim dH₂O ile seyreltildi. 20 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak bekletildikten sonra 0,22 μ m membran filtresi ile filtrelendi ve kullanıldı.

3.9.2. Oil Red O boyama metodunun uygulanması

Protokolün 8'nci gününde deney sonlandırıldı. Dikkatlice kuyucuklardan medyum tamamen uzaklaştırıldı, hücrelerin üzerine %10'luk formalin eklendi ve 5 dakika boyunca bekletildi. Kuyucuklardan formalin uzaklaştırıldı. Ardından kuyucuklara tekrar formalin eklendi ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde pleytler inkübatörden çıkarıldı. Kuyucuklardaki formalin tamamen uzaklaştırıldı ve kuyucuklara %60'lık izopropanol ile yıkama işlemi yapıldı. Pleytler iyice kurutuldu. Sonrasında her kuyucuğa daha önceden hazırlanan Oil red O çalışma solüsyonundan 200 µl eklendi. Bu aşamada hücreler karanlık ortamda orbital çalkalayıcı üzerinde 1000 rpm hızda oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edildi. Oil Red O solüsyonu kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Ardından hücrelere penetre olmamış Oil Red O'nun kuyucuklardan uzaklaştırılması amacı ile kuyucuklar 4 kez dH₂O ile yıkandı. Bu aşamada pleytler inverted mikroskop altına alındı ve hücreler görüntülendi. Ardından dH₂O kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar iyice kurutuldu. Yağ hücrelerinin içinde bulunan Oil Red O'yu açığa çıkarmak için kuyucuklara %100 izopropanol eklendi. Pleytler 10 dakika boyunca ışıktan korunarak çalkalandı. Sonrasında kuyucuklardan pipetaj yaparak 150 µl çözelti alındı ve 96'lık ELISA pleytlerine aktarıldı. Pleytler ELISA cihazında 490 nm absorbansta ölçüldü.

3.10. Migrasyon Deney Serileri

Hücre göçünün değerlendirilmesi amacı ile 24, 48 ve 72 saatlik migrasyon deney serileri planlandı. Hücre sayımının ardından 24'lük pleytlere her kuyucuğa 50.000 hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin tam olarak konflue olması beklenildi. Hücreler beklenen yoğunluğa ulaştıktan sonra kuyucuklardaki medyum çekilip atıldı. Tutarlı bir ölçüm yapabilmek amacı ile hücrelerin ekimi yapılmadan önce kuyucukların dış taban kısmına 3'er adet yatay referans çizgisi çizildi. 200 µl pipet uçları kullanılarak kuyucuk tabanına tam ortadan dikey bir şekilde 300-750 mm arasındaki genişlikte yara açıldı. Çizim işlemi sonrasında tabandan kalkan hücrelerin uzaklaştırılması amacı ile serum, penisilin-streptomisin ve glutamin içermeyen DMEM ile yıkama işlemi yapıldı. Kuyucuklara komplete medyum (%10 BCS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM) eklendi ve niklozamid (0,25 µM) varlığında ya da yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulandı. Kontrol gruplarına ise aynı konsantrasyonda DMSO içeren aynı hacimde kontrol çözeltisi uygulandı. Bir gruba da tek başına niklozamid uygulandı.



Şekil 2.5. Migrasyon Deneyi. Monolayer konflue olmuş hücrelerin (A) bulunduğu tabana pipet yardımı ile dikey bir şekilde yara açılır (B). Aynı gün yara genişliğinin görüntüsü ve ölçümü alınır (C). Hücre göçünü tayini için yara genişliğinin görüntüsü ve ölçümü alınır (D) [105].

Deney serileri:

- DMSO Kontrol Grubu (n=4)
- 2,5 μ M Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 5 μ M Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 10 μ M Apigenin uygulanan grup (n=4)
- 0,25 μ M Niklozamid uygulanan grup (n=4)
- 2,5 μ M Apigenin + 0,25 μ M Niklozamid (n=4)
- 5 μ M Apigenin + 0,25 μ M Niklozamid (n=4)
- 10 μ M Apigenin + 0,25 μ M Niklozamid (n=4)

İlaç uygulandıktan sonra her kuyucukta açılan yaranın 0. gün görüntüleri alındı. Sonrasında 24, 48 ve 72. saatte aynı bölgelerden görüntü alınıp yara açıklığının değerlendirilmesi yapıldı. Görüntüler mikroskobun 4x boyutuna ayarlanıp alındı.

3.10.1. Migrasyon Analizi

200 μ l pipet uçları kullanılarak açılan yaranın ölçümü ve fotoğraflaması için pleytler 4x boyutunda ayarlanan mikroskop altına alındı. Referans çizgileri baz alınarak kuyucuğun 3 noktasından yaranın görüntüsü alınıp ölçümü yapıldı. Bu işlem günasırı medyum değiştirilerek 24, 48 ve 72. saatte tekrarlandı. Alınan görüntüler ve ölçümden yara açıklığının değerlendirmesi yapıldı.

3.11. İstatistiksel Analiz

Diferansiyasyon, proliferasyon ve viabilite deney serileri kolorimetrik olarak; migrasyon deney serisi mikrometrik olarak değerlendirildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel değerlendirme için tek yönlü ANOVA'yı takiben Dunnet *post- hoc* testi kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

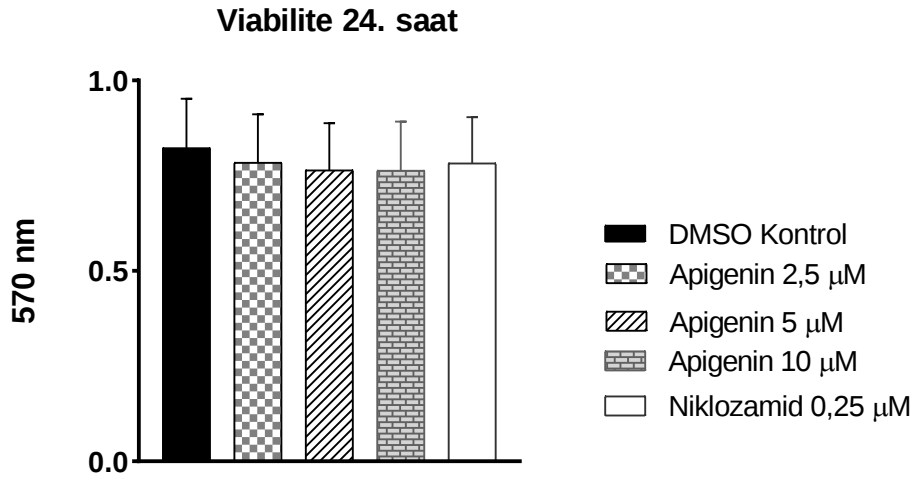


4. BULGULAR

4.1. Viabilite Deney Sonuçları

4.1.1. 24 Saat

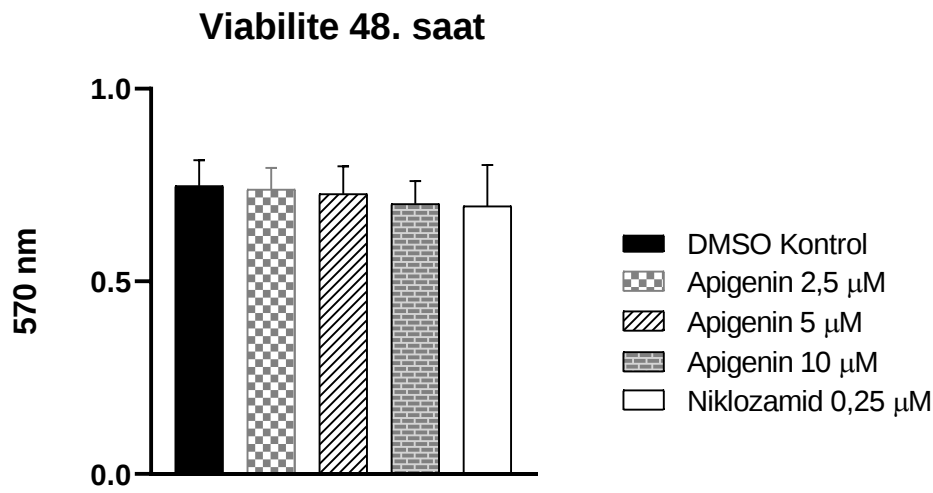
Apigenin ve niklozamidin 3T3-L1 preadiposit hücreleri viabilitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi için hücrelere apigenin (2,5, 5 ve 10 μ M) ve niklozamid uygulaması (0,25 μ M) yapıldı. Kontrol grubuna ise aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulandı. 24 saatin sonunda MTT çalışma solüsyonu ile viabilite analizi yapıldı. Apigenin ve niklozamid 24 saatin sonunda uygulanan dozlarda viabilite üzerinde anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Apigenin ve niklozamid uygulamasının 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin viabilitesi üzerinde etkisi (24 saat). Kuyucuklara apigenin (2,5, 5 ve 10 μ M) ve niklozamid (0,25 μ M) uygulandı (n=4). 24 saatin sonunda MTT analiz yöntemi ile apigenin ve niklozamidin etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.1.2. 48 Saat

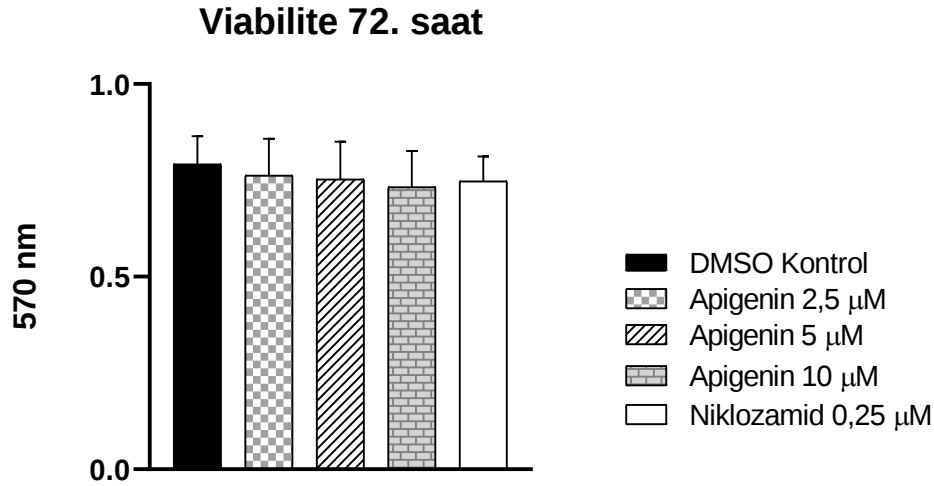
Apigenin ve niklozamidin 3T3-L1 preadiposit hücreleri viabilitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi için hücrelere apigenin (2,5, 5 ve 10 μM), niklozamid (0,25 μM) ve kontrol grubuna aynı oran ve hacimde DMSO uygulandı. 48 saatin sonunda MTT çalışma solüsyonu ile viabilite analizi yapıldı. Apigenin ve niklozamid 48 saatin sonunda uygulanan dozlarda viabilite üzerinde anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Apigenin ve niklozamid uygulamasının 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin viabilitesi üzerinde etkisi (48 saat). Kuyucuklara apigenin (2,5, 5 ve 10 μM) ve niklozamid (0,25 μM) uygulandı (n=4). 48 saatin sonunda MTT analiz yöntemi ile apigenin ve niklozamidin etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.1.3. 72 Saat

Apigenin ve niklozamidin 3T3-L1 preadiposit hücreleri viabilitesi üzerindeki etkisinin incelenmesi için hücrelere apigenin (2,5, 5 ve 10 μM) ve niklozamid uygulaması (0,25 μM) yapıldı. Kontrol grubuna ise aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulandı. 72 saatin sonunda MTT çalışma solüsyonu ile viabilite analizi yapıldı. Apigenin ve niklozamid 72 saatin sonunda uygulanan dozlarda viabilite üzerinde anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.3.).

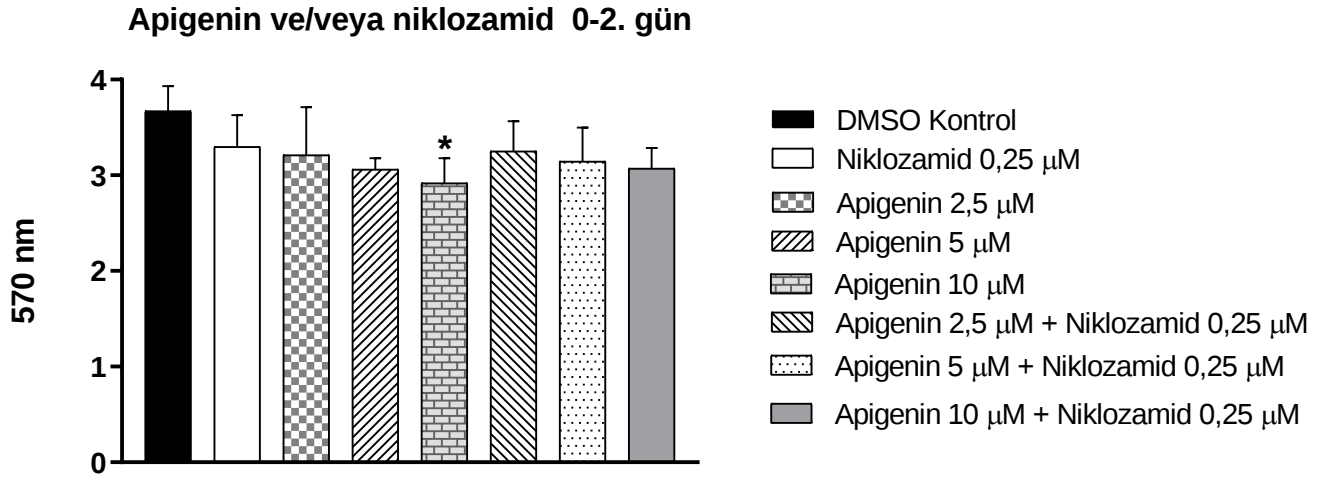


Şekil 4.3. Apigenin ve niklozamid uygulamasının 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin viabilitesi üzerinde etkisi (72 saat). Kuyucuklara apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) ve niklozamid (0,25 µM) uygulandı (n=4). 72 saatin sonunda MTT analiz yöntemi ile apigenin ve niklozamidin etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post- hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.2. Proliferasyon Deney Sonuçları

4.2.1. 0-2'inci gün

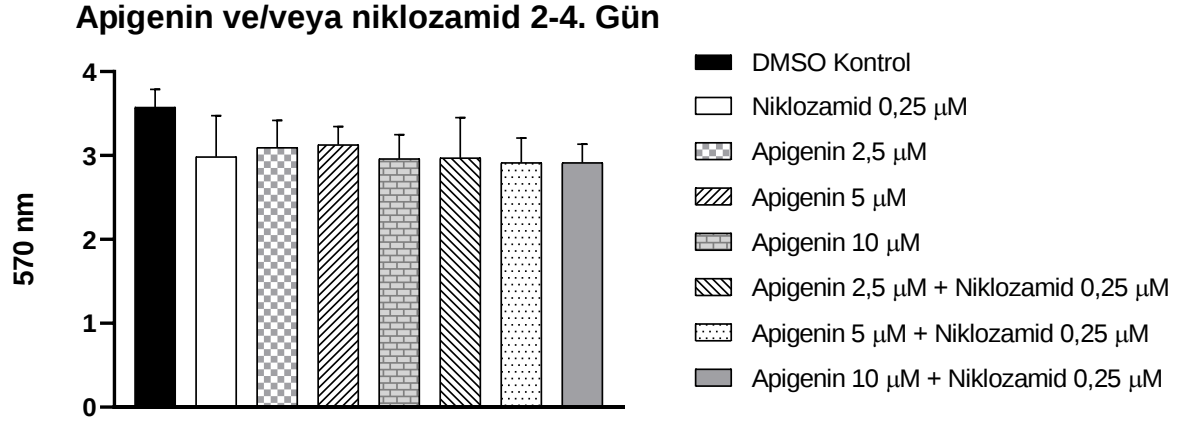
Apigenin ve niklozamidin 3T3-L1 preadiposit hücreleri proliferasyonu üzerindeki etkisinin incelendiği deney serilerinde standart diferansiyasyon protokolünün 0-2'inci günleri arasında hücrelere niklozamid (0,25 µM) varlığında ya da yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulandı. Kontrol grubuna ise aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulandı. Protokolün 2-4'üncü günleri arasında hücrelere 1 µM insülin içeren FBS'li medyum uygulandı. Protokolün 4. gününde MTT çalışma solüsyonu ile proliferasyon analizi yapıldı. Hücrelere proliferasyon sürecinin 0-2'inci günleri aralığında 10 µM apigenin uygulanması proliferasyon üzerinde anlamlı bir azalmaya sebep oldu (Şekil 4.4.). Niklozamid ön uygulaması bu azalmayı ortadan kaldırdı.



Şekil 4.4. Niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulanmasının 3T3-L1 preadiposit hücreleri proliferasyonu üzerine etkisi (0-2'inci gün). Kuyucuklara apigenin ve niklozamid uygulandı (n=4). Protokolün 4. gününün sonunda MTT analiz yöntemi ile apigenin ve niklozamidin etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. P<0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.2.2. 2-4'üncü gün

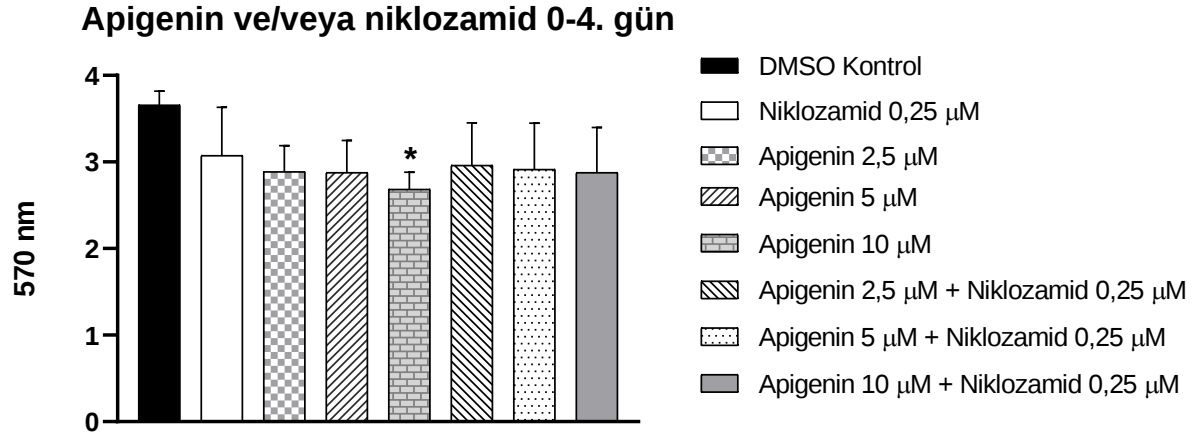
Apigenin ve niklozamidin 3T3-L1 preadiposit hücreleri proliferasyonu üzerindeki etkisinin incelendiği deney serilerinde standart diferansiyasyon protokolünün 2-4'üncü günleri arasında hücrelere niklozamid (0,25 µM) varlığında ya da yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) ve kontrol gruplarına ise aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulandı. Protokolün 2-4'üncü günleri arasında hücrelere 1 µM insülin içeren FBS'li medyum uygulandı. Protokolün 4'üncü gününde MTT çalışma solüsyonu ile proliferasyon analizi yapıldı. Apigenin ve/veya niklozamid 2-4'üncü gün aralığında uygulanan dozlarda proliferasyon üzerinde anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulanmasının 3T3-L1 preadiposit hücreleri proliferasyonu üzerine etkisi (2-4'üncü gün). Kuyucuklara apigenin ve niklozamid uygulandı (n=4). Protokolün 4'üncü gününün sonunda MTT analiz yöntemi ile apigenin ve niklozamidin etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.2.3. 0-4'üncü gün

Apigenin ve niklozamidin 3T3-L1 preadiposit hücreleri proliferasyonu üzerindeki etkisinin incelendiği deney serilerinde standart diferansiyasyon protokolünün 0-4'üncü günleri arasında hücrelere niklozamid (0,25 µM) varlığında ya da yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) ve kontrol gruplarına ise aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulandı. Protokolün 4'üncü gününde MTT çalışma solüsyonu ile proliferasyon analizi yapıldı. Hücrelere 0-4'üncü gün aralığında 10 µM apigenin uygulanması proliferasyon üzerinde anlamlı bir azalmaya sebep oldu. Niklozamid ön uygulaması bu azalmayı ortadan kaldırdı. (Şekil 4.6.)



Şekil 4.6. Niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulanmasının 3T3-L1 preadiposit hücreleri proliferasyonu üzerine etkisi (0-4'üncü gün). Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post- hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.3. Diferansiyasyon Deney Sonuçları

4.3.1. 0-4'üncü gün

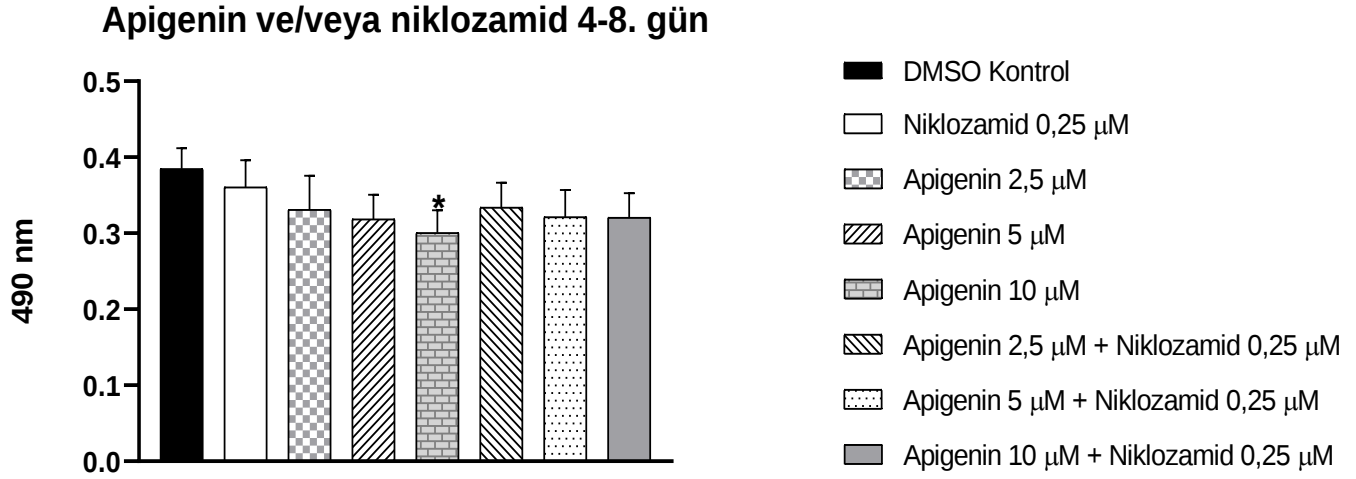
Ekimi yapılan 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin konfluent olduğu gün protokolün -2'inci günü olarak kabul edildi. Hücreler BCS içeren komplete medyumda 2 gün daha bekletildi ve postkonfluent 2'inci gün protokolün 0'ıncı günü kabul edildi. Hücrelere diferansiyasyon sürecinin 0-4'üncü günleri boyunca niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulaması yapıldı. Kontrol grubunda kuyucuklara aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulandı. Diferansiyasyon sürecinin 8'inci gününün sonunda deney sonlandırıldı ve Oil Red O boyaması ile diferansiyasyon değerlendirilmesi yapıldı. Hücrelere diferansiyasyon sürecinin 0-4'üncü gün aralığında 10 µM apigenin uygulanması diferansiyasyon üzerinde anlamlı bir azalmaya sebep oldu. Niklozamid ön uygulaması bu azalmayı ortadan kaldırdı (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda 0-4'üncü gün apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyonu üzerine etkisi. Diferansiyasyon protokolünün 0-4'üncü günleri aralığında hücrelere apigenin ve niklozamid uygulandı (n=4). Deney protokolünün 8'inci gününün sonunda Oil Red O Boyama ile apigenin ve niklozamidin etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. P<0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.3.2. 4-8'inci gün

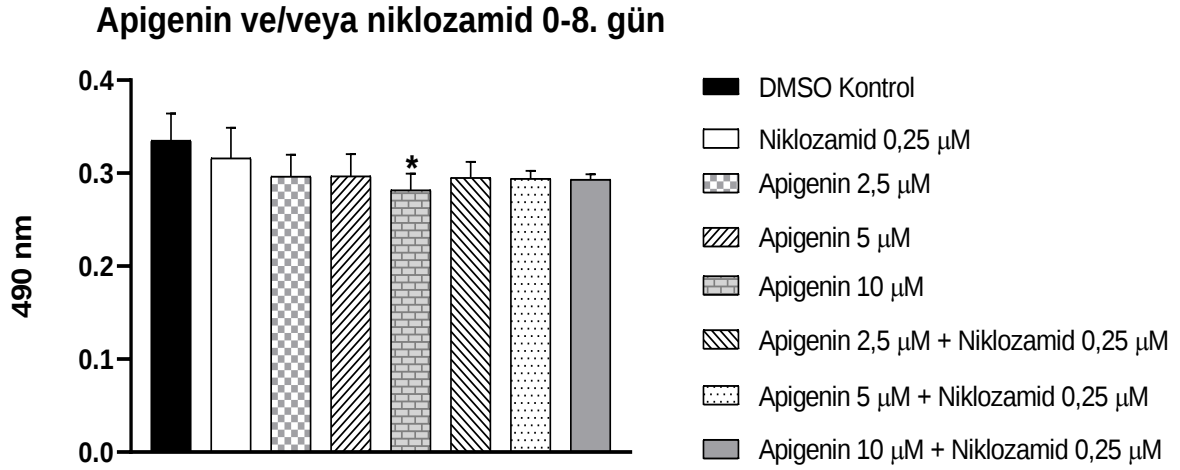
Hücrelere diferansiyasyon sürecinin 4-8'inci günleri boyunca niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) ve kontrol gruplarına aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulaması yapıldı. Diferansiyasyon sürecinin 8'inci gününün sonunda deney sonlandırıldı ve Oil Red O boyaması ile diferansiyasyon değerlendirilmesi yapıldı. Hücrelere diferansiyasyonun 4-8'inci günleri aralığında 10 µM apigenin uygulanması diferansiyasyon üzerinde anlamlı bir azalmaya sebep oldu. Niklozamid ön uygulaması ise bu azalmayı ortadan kaldırdı. (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri diferansiyasyonu üzerine etkisi (4-8'inci gün). Diferansiyasyon protokolünün 4-8'inci günleri aralığında hücrelere apigenin ve niklozamid uygulandı (n=4). Sürecin 8'inci Gününün sonunda Oil Red O Boyama ile apigenin ve niklozamidin etkisi değerlendirildi. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. P<0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi.

4.3.3. 0-8'inci gün

Hücrelere diferansiyasyon sürecinin 0-8'inci günleri boyunca niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) ve kontrol gruplarına aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulaması yapıldı. Diferansiyasyon sürecinin 8'inci gününün sonunda deney sonlandırıldı ve Oil Red O boyaması ile diferansiyasyon değerlendirilmesi yapıldı. Hücrelere diferansiyasyon sürecinin 0-8'inci günleri aralığında 10 µM apigenin uygulanması diferansiyasyon üzerinde anlamlı bir azalmaya sebep oldu. Niklozamid ön uygulaması ise bu azalmayı ortadan kaldırdı (Şekil 4.9.).

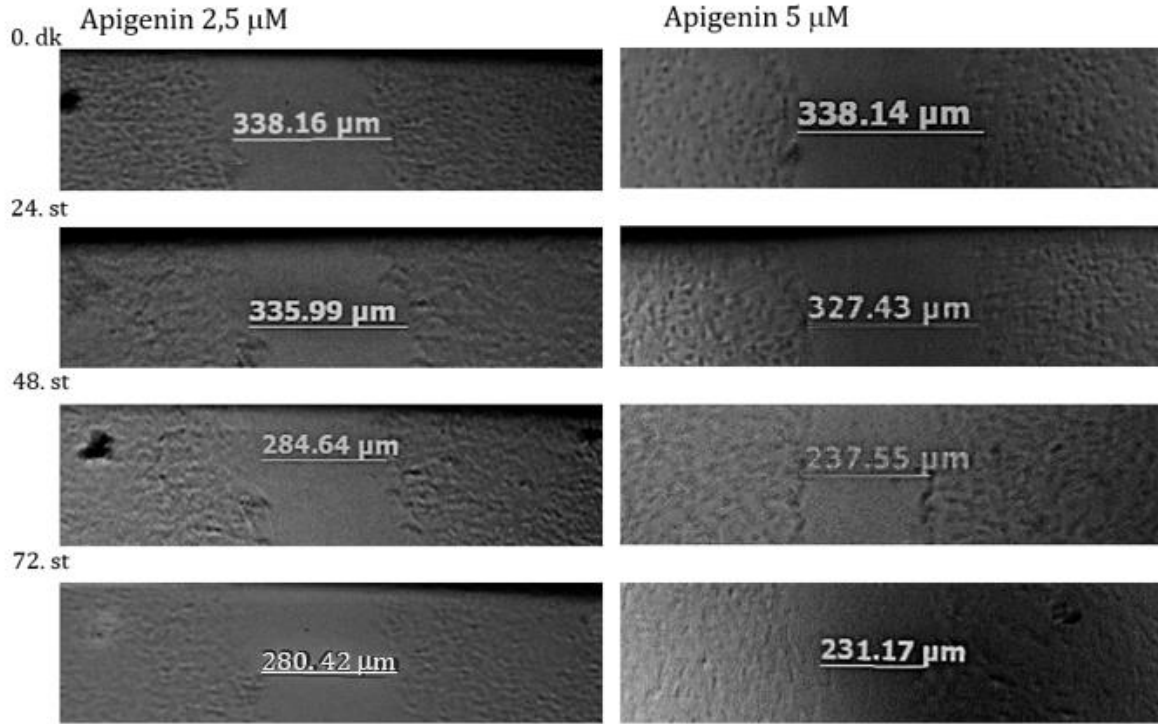


Şekil 4.9. Niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri diferansiyasyonu üzerine etkisi (0-8'inci gün). Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi.

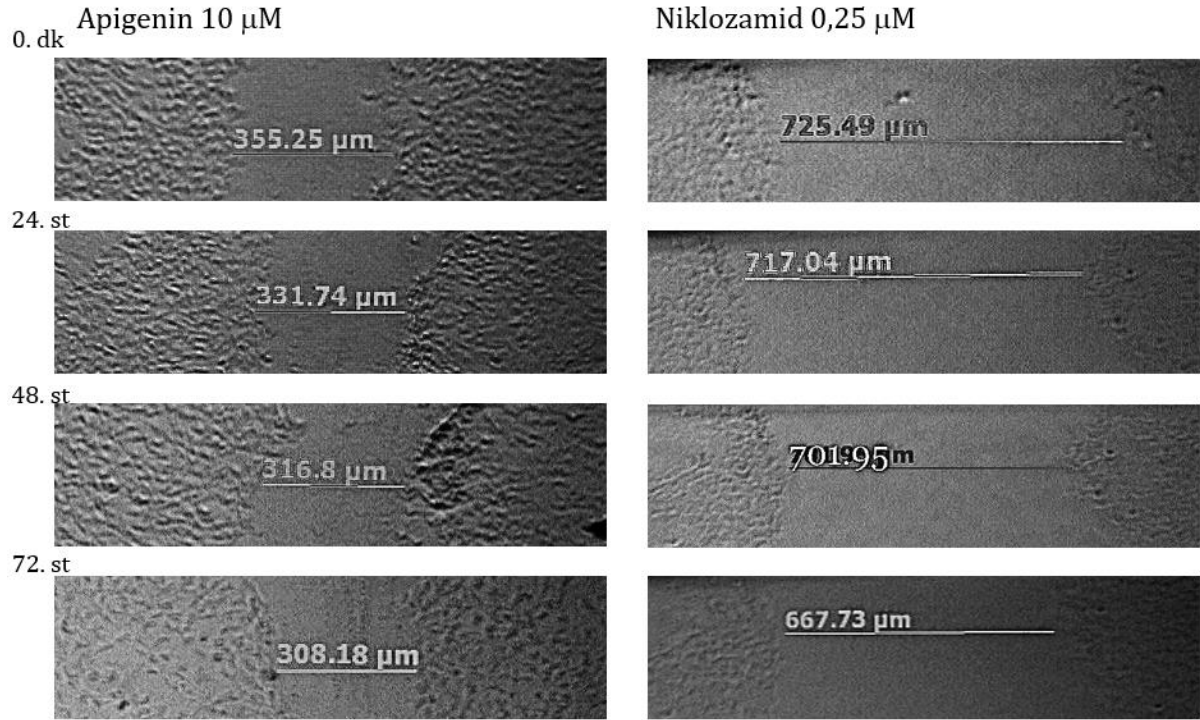
4.4. Migrasyon Deney Sonuçları

4.4.1. 24 Saat

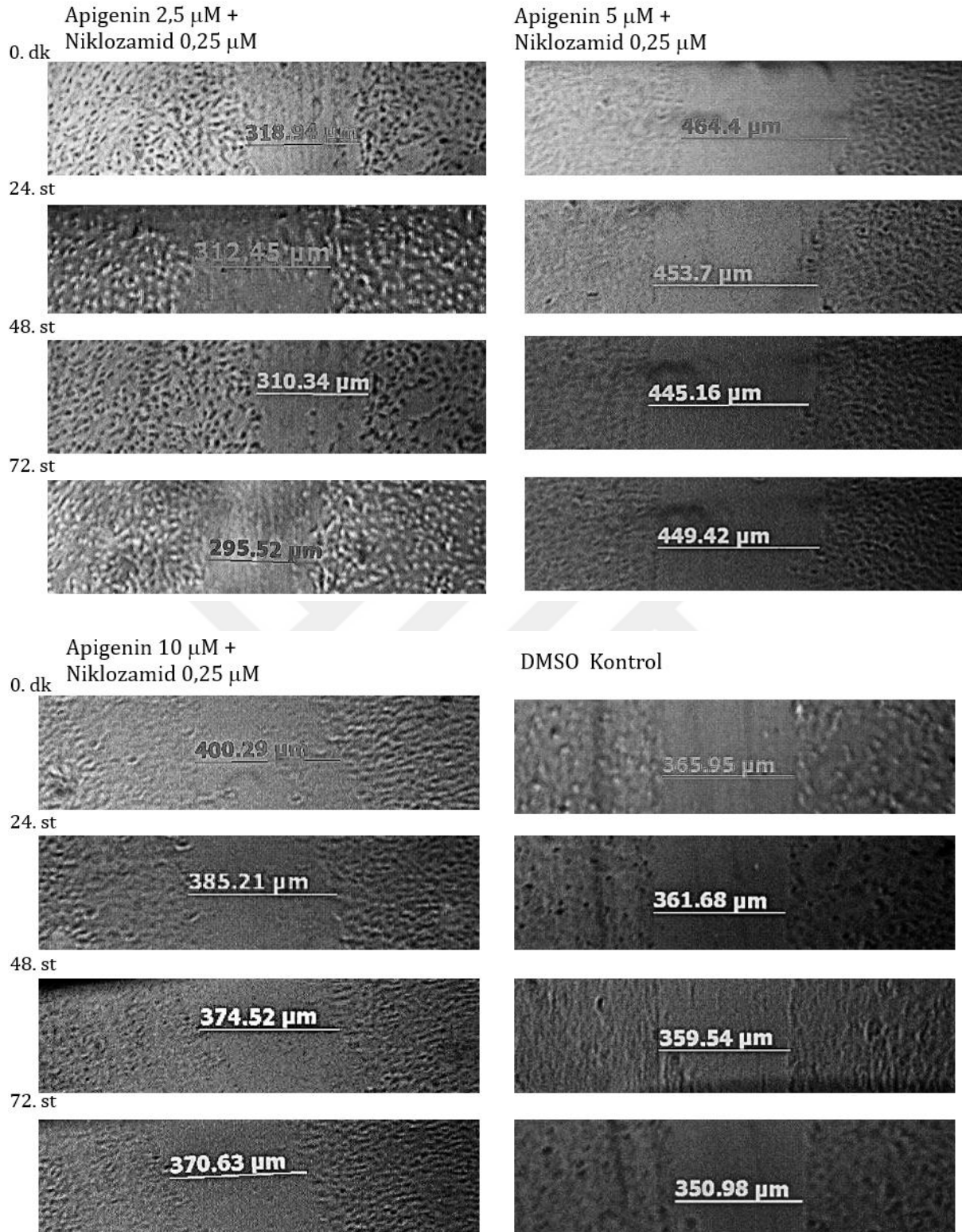
Hücre ekimi yapılmadan önce, tutarlı bir ölçüm yapabilmek amacı ile kuyucukların dış taban kısmına 3'er adet yatay referans çizgisi çizildi. Daha sonra ekimi yapılan hücreler beklenen yoğunluğa ulaştığında kuyucuklardaki medyum çekilip atıldı. 200 µl pipet uçları kullanılarak kuyucuk tabanına referans çizgilerinin tam ortasından dikey bir şekilde 300-750 mm arası genişliğinde yara açıldı. Çizim işlemi sonrasında tabandan kalkan hücrelerin uzaklaştırılması amacı ile serum, penisilin-streptomisin ve glutamin içermeyen DMEM ile yıkama işlemi yapıldı. Kuyucuklara BCS içeren komplete medyum eklendi ve niklozamid (0,25 µM) varlığında ya da yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulandı. Ek olarak kontrol gruplarına aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulandı. Hücre göçünün değerlendirilmesi için 24 saatin sonunda hücrelerin bulunduğu pleyt 4x boyutunda ayarlanan mikroskop altına alındı ve referans çizgileri baz alınarak yara açıklığının ölçümü ve fotoğrafı alındı (Şekil 4.10). Apigeninin 2,5, 5 ve 10 µM uygulanması migrasyonda doza bağlı bir artışa sebep oldu, bu artış anlamlı bulunmadı. Apigenin aynı dozlarda niklozamid (0,25 µM) ile birlikte uygulandığında ise bu artışı kısmen baskıladığı gözlemlendi. Ek olarak niklozamidin (0,25 µM) tek başına uygulanmasıyla migrasyonda anlamlı olmayan bir artış gözlemlendi (Şekil 4.11).



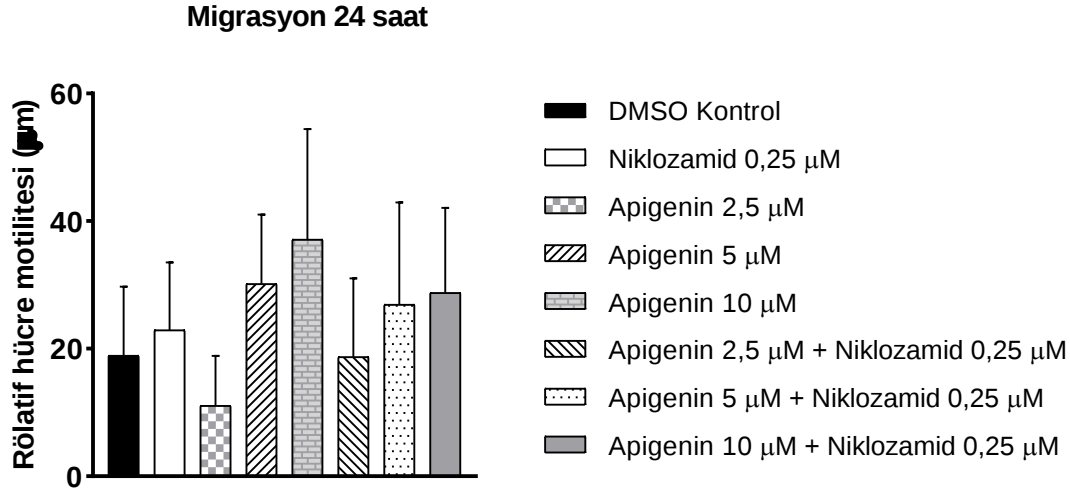
Şekil 4.10. Niklozamid (0,25 μ M) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 μ M) uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri migrasyonu üzerine etkisi (0-72'inci saat). Protokolün 24, 48 ve 72 saatleri boyunca hücrelere niklozamid (0,25 μ M) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 μ M) uygulandı.



Şekil 4.10. (devamı) Niklozamid (0,25 μ M) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 μ M) uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri migrasyonu üzerine etkisi (0-72'inci saat). Protokolün 24, 48 ve 72 saatleri boyunca hücrelere niklozamid (0,25 μ M) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 μ M) uygulandı.



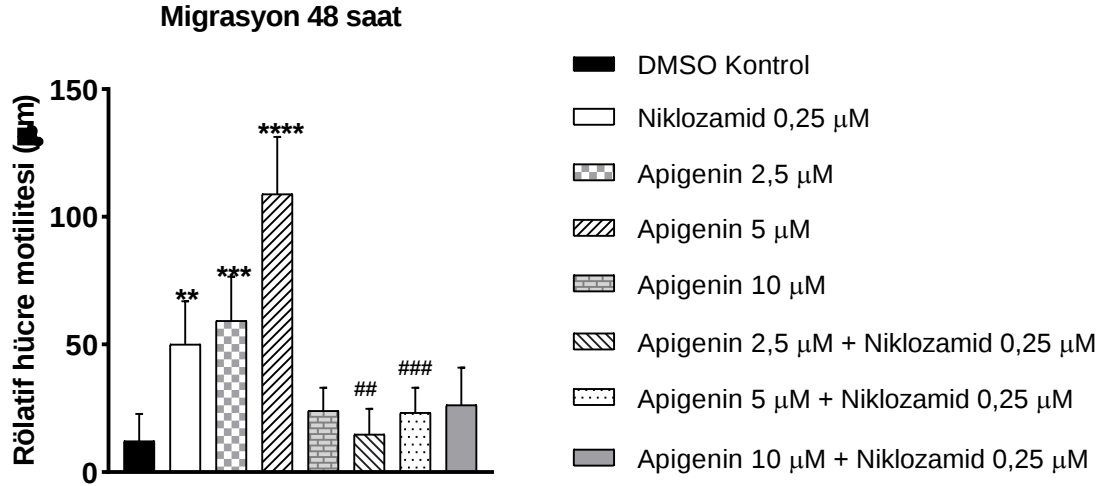
Şekil 4.10. (devamı) Niklozamid (0,25 μ M) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 μ M) uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri migrasyonu üzerine etkisi (0-72'inci saat). Protokolün 24, 48 ve 72 saatleri boyunca hücrelere niklozamid (0,25 μ M) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 μ M) uygulandı.



Şekil 4.11. Niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri migrasyonu üzerine etkisi (24'ncü saat). Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Dunnet *post-hoc* test kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi. * Kontrolle göre anlamlılık, # niklozamid ön uygulamasına göre anlamlılık.

4.4.2. 48 Saat

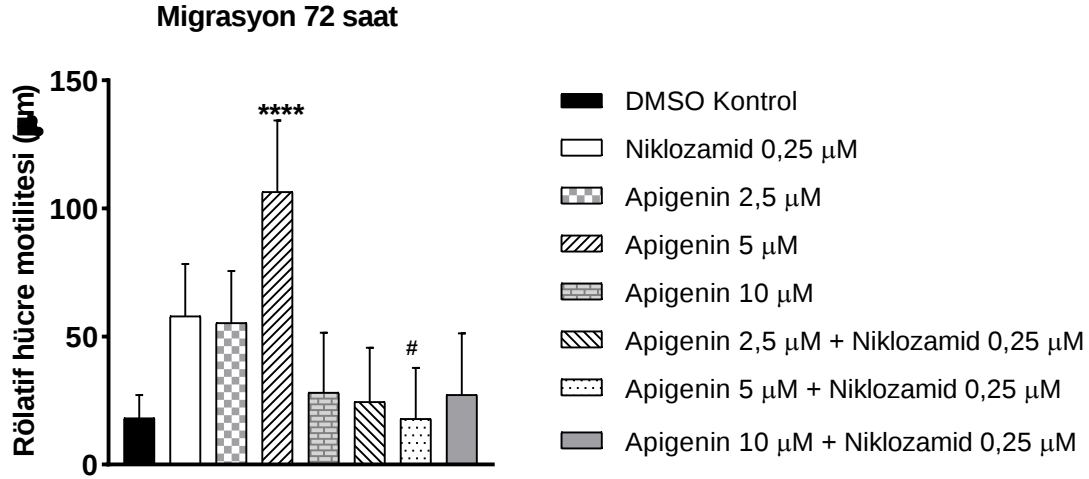
Hücrelerin bulunduğu kuyucuklara niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) ve kontrol gruplarına aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulandı. Hücre göçünün değerlendirilmesi için 48 saatin sonunda hücrelerin bulunduğu pleyt mikroskop altına alındı ve yara açıklığının ölçümü yapıldı. Hücrelerin 48 saat boyunca 2,5 ve 5 µM apigenine maruz bırakılması migrasyonda anlamlı bir artışa sebep oldu. Bununla birlikte kuyucuklara 10 µM apigenin uygulandığında hücre migrasyonunda bir artış görülmedi. İlginç olarak niklozamidin (0,25 µM) tek başına uygulanması migrasyonda anlamlı bir artışa sebep oldu. Niklozamid ön uygulaması 2,5 ve 5 µM apigeninin hücre migrasyonunu artırıcı etkisini ortadan kaldırdı (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri migrasyonu üzerine etkisi (48'inci saat). Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. P<0.05 olan değerler anlamlı kabul edildi. * Kontrole göre anlamlılık, # niklozamid ön uygulamasına göre anlamlılık.

4.4.2. 72 Saat

Kuyucuklara niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) ve kontrol gruplarına da aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulandı. Değerlendirme için 72 saatin sonunda pleyt mikroskop altına alındı ve yara açıklığının ölçümü yapıldı. Hücrelerin 72 saat boyunca 5 µM konsantrasyonunda apigenine maruz bırakılması migrasyon oranında anlamlı bir artışa sebep oldu. Apigeninin aynı dozlarda niklozamid (0,25 µM) ile birlikte uygulanmasıyla, bu artış ortadan kalktı. Ek olarak niklozamidin (0,25 µM) tek başına uygulanmasıyla migrasyonda bir artış gözlemlendi ancak bu artış anlamlı bulunmadı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Niklozamid (0,25 µM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulamasının 3T3-L1 preadipositleri migrasyonu üzerine etkisi (72'inci saat). Hücrelere niklozamid (0,25 µM) varlığında veya yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 µM) uygulandı ve 72 saat sonra hücreler mikroskop altına alınıp yara açıklığı ölçümü yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi ve istatistiksel karşılaştırma için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Dunnet *post-hoc* test olarak kullanıldı. $P < 0.05$ olan değerler anlamlı kabul edildi. * Kontrole göre anlamlılık, # niklozamid ön uygulamasına göre anlamlılık.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Enerji alımı ve harcanması arasındaki dengesizlik ile ilişkili olan obezite, enerji metabolizmasının kontrol edildiği yağ dokusunun büyüme ve genişlemesinden kaynaklanmaktadır. Hiperlipidemi, hipertansiyon, ateroskleroz ve tip 2 diyabet gibi çeşitli metabolik hastalıklara sebep olabilen obezitenin önlenmesi kritik bir öneme sahiptir. Yağ dokusunun miktarı, adipogenez sürecinin baskılanması ile düzenlenebilmektedir. Bu çalışmada 3T3-L1 preadiposit hücrelerinde, antiadipojenik etki göstereceği düşünülen apigeninin hücre viabilitesi, proliferasyonu, diferansiyasyonu ve migrasyonu üzerindeki etkileri araştırıldı.

Hücre viabilitesinin incelendiği deney serilerinde, apigenin (2,5, 5 ve 10 μM ; 24, 48 ve 72 saat) ve niklozamidin (0,25 μM ; 24, 48 ve 72 saat) hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmedi. Çalışmamızda Wnt sinyal yolağını inhibe etmek için öncelikle 0,5 μM niklozamid kullandık, fakat bu konsantrasyonda hücre canlılığında bir miktar azalma gözlemlendi. Bu yüzden, niklozamidi literatürde Wnt sinyal yolunu inhibe ettiği gösterilen 0,25 μM konsantrasyonunda uyguladık [106]. Literatüre bakıldığında, Mafuyu Ono ve Ko Fujimori'nin yaptıkları çalışmada, 3T3-L1 hücrelerine 0-50 μM arasında apigenin uygulanmıştır ve 1,4 ve 8 gün boyunca inkübe edilmiştir. Apigeninin 10 μM konsantrasyonuna kadar hücre canlılığında herhangi bir azalma görülmemiştir. Fakat 50 μM apigenin uygulanması ile hücre canlılığında azalma gözlenmiştir [86]. Yakın zamanda Rebecca C. Arend ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, kanser hücrelerine 0,5, 1,5 ve 7 μM niklozamid uygulanarak niklozamidin sitotoksitesisi ölçülmüştür. Niklozamidin 0,5 μM uygulanması hücrelerin viabilitesini %10 azaltmıştır [107]. Bu yönü ile bulgularımız literatür ile uyumludur. Bu sonuçlar, çalışmamızdaki apigenin ve niklozamidin 3T3-L1 preadiposit viabilitesi üzerindeki etkisi ile örtüşmektedir. Sonuç olarak, apigenin ve niklozamidin, bu tez çalışmasında bulunan 3T3-L1 preadipositlerinin diferansiyasyon, proliferasyon ve migrasyonu üzerindeki etkilerinin hücre toksisitesinden bağımsız olduğu düşünülebilir.

Adipogenez, obezitede anahtar rol oynayan bir süreçtir. Çalışmamızda, adipogenez sürecinin önemli bir aşaması olan mitotik klonal ekspansiyon aşamasında gerçekleşen hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla 3T3-L1 preadiposit hücrelerine, proliferasyon sürecinin 0-2, 2-4 ve 0,4'üncü günleri boyunca niklozamid (0,25 μM) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 μM) uygulandı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Proliferasyon sürecinin 0-2 ve 0-4'üncü günlerinde 10 μM apigenin uygulanması, 3T3-L1 preadiposit proliferasyonunu anlamlı ölçüde baskıladı. Wnt inhibitörü niklozamid ön uygulaması apigeninin yol açtığı bu baskılamayı ortadan kaldırdı. Bununla birlikte, apigeninin proliferasyonun 2-4'üncü günleri arasında hücre kültür ortamına uygulanmasının hücre proliferasyonu üzerine herhangi

bir etkisi bulunmadı. Bu bulgular ışığında, apigeninin adipogenez sürecinin erken evresinde antiadipojenik etkinlik gösterdiği düşünüldü. Ek olarak, apigeninin hücrelere Wnt sinyal yolağı inhibitörü niklozamid ön uygulamasının uygulanmasının proliferasyondaki baskılanmayı kısmen ortadan kaldırması, apigeninin antiproliferatif etkisinin Wnt sinyal yolağı üzerinden olabileceğini düşündürdü.

3T3-L1 preadiposit hücreleri tam olarak konflue olduğunda büyüme durması ve ardından yönlenme (commitment) gerçekleşir. Bu aşamanın bitiminde hücrelere farklılaştırma kokteyli uygulanır, diferansiyasyon süreci başlar. 3T3-L1 preadiposit farklılaşmasının değerlendirildiği deney serilerinde hücrelere diferansiyasyon sürecinin 0-4, 4-8 ve 0-8'inci günleri boyunca niklozamid (0,25 μ M) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 μ M) uygulandı. Oil Red O boyama ile farklılaşma değerlendirildiğinde, tüm zaman aralıklarında hücrelere 10 μ M apigenin uygulanmasının preadiposit farklılaşmasını anlamlı ölçüde baskıladığı gözlemlendi. Apigenin 2,5 ve 5 μ M konsantrasyonda ise diferansiyasyonu bir miktar baskılamakla birlikte bu artış anlamlı bulunmadı. Wnt inhibitörü niklozamid ön uygulaması ise hücre kültür ortamına 10 μ M konsantrasyonda uygulanan apigeninin diferansiyasyonu baskılayıcı etkisini ortadan kaldırdı. Niklozamid tek başına uygulandığında diferansiyasyon üzerine bir etki oluşturmadi. Bu bulgular apigeninin preadiposit diferansiyasyonu üzerine oluşturduğu supresyona Wnt sinyal yolağının aracılık ediyor olabileceğini düşündürdü.

3T3-L1 preadiposit hücrelerinin diferansiyasyon aşaması başta C/EBP protein grubu ve PPAR γ olmak üzere önemli transkripsiyon faktörleri tarafından kademeli ve karmaşık bir şekilde düzenlenir. 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin postkonfluent 2'inci günü hücrelere farklılaştırma kokteyli verildiğinde, diferansiyasyonun erken evresinde (ilk 2 gün) rol alan C/EBP δ ve C/EBP β aktive olur ve farklılaşma süreci başlar. Bu transkripsiyon faktörleri, daha sonra, C/EBP α ve PPAR- γ proteinlerinin aktivasyonunu sağlar ve diferansiyasyonun erken evresinden bitimine kadar ekspresyonları devam eder [108]. Çalışmamızdaki proliferasyon bulguları ele alındığında, hücrelere proliferasyon sürecinin 0-2 ve 0-4'üncü günleri boyunca 10 μ M apigenin uygulanmasının proliferasyonu suprese etmesi, apigeninin, erken evrede aktive olan C/EBP δ ve C/EBP β proteinlerinin ekspresyonunu baskılaması yoluyla olabileceği düşünüldü. Ayrıca diferansiyasyon bulgularımız değerlendirildiğinde, diferansiyasyonun 0-4, 4-8 ve 0-8'inci günleri aralığında uygulanan 10 μ M apigenin, hücre farklılaşmasını anlamlı düzeyde suprese etti. Bu bağlamda, diferansiyasyonun başlangıcından bitimine kadar olan süreçte gözlenen apigeninin bu etkisini, C/EBP δ ve C/EBP β proteinlerine ek olarak C/EBP α ve PPAR- γ transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu da baskılayarak gösterdiği düşünüldü. Bunlara ek olarak, hücre gelişimi ve farklılaşması gibi hücresel olaylarda önemli rol oynayan Krüppel benzeri faktörlerin (Kruppel-Like Factor, KLF) adipogenez destekleyici veya engelleyici rolleri olduğu bilinmektedir.

Yapılan bir çalışmada adipojenik KLF9 transkripsiyon faktörü ekspresyonunun 3T3-L1 preadiposit farklılaşmasının geç evresinde arttığı ve PPAR- γ seviyesini artırarak diferansiyasyonu desteklediği gözlenmiştir [109]. Bu bağlamda, 10 μ M apigeninin, diferansiyasyonun 4-8'inci günlerinde gösterdiği antiadipojenik etkiyi KLF9 ekspresyonunu baskılayarak da yapmış olabileceği düşünüldü. Ayrıca, 3T3-L1 preadipositlerinde yapılan bir çalışmada, 1, 10 ve 50 μ M apigenin uygulaması, PPAR- γ ve bunun hedef genleri olan yağ asidi bağlayıcı protein 4 (fatty acid binding protein 4, aP2) ve stearyl-CoA desatürazı (stearyl-CoA desaturase, SCD) baskılamıştır. Çalışmada apigeninin AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) fosforilasyonunu artırdığı gösterilmiş ve adipogenezi suprese edici etkisine AMPK sinyal yolağı aktivasyonunun aracılık ediyor olabileceği öne sürülmüştür [88]. Bu bağlamda, apigeninin antiadipojenik etkisinin AMPK sinyal yolağı aktivasyonunu da içerebileceği düşünülebilir. Bununla birlikte bu varsayımların doğrulanabilmesi için ek deneylere ihtiyaç vardır.

Yara iyileşme modeli ile hücre göçünün değerlendirildiği deney serilerinde 3T3-L1 preadiposit hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca niklozamid (0,25 μ M) varlığında ve yokluğunda apigenin (2,5, 5 ve 10 μ M) ve kontrol grubuna aynı hacim ve konsantrasyonda DMSO uygulanarak hücre göçü değerlendirmesi yapıldı. Bu aşamada, ilk migrasyon deneylerinde hücrelerin bazal aktivitelerinin azaltılması ve serumun içinde bulunan büyüme faktörlerinin etkisinin hücre cevabını etkilememesi amacı hücrelere serumsuz medyum uygulandı. Fakat bu uygulama ile hücre viabilitesinin belirgin olarak azaldığının görülmesi üzerine hücrelere BCS içeren komplete medyum uygulandı. Bununla birlikte, elde edilen migrasyon bulguları değerlendirildiğinde serum içeren medyum uygulanmasının hücre migrasyonunu etkileyebilme olasılığının da göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Ancak, yakın zamanda yapılan bir çalışmada hücrelerin serumsuz bırakılmasının hücre tipine ve uygulama süresine bağlı olarak karmaşık ve öngörülemez etkiler yapabildiği gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada hücrelerin serumsuz bırakılmasının bazal aktivitenin azalması açısından üniform bir yanıt oluşturmadığı ortaya konulmuştur [110]. Bu bilginin ışığında, 3T3-L1 hücre viabilitesinin serumsuz ortamda belirgin şekilde azaldığı da göz önüne alındığında düşük düzeyde büyüme faktörü içeren BCS eklenmiş medyum kullanılması bir gereklilik gibi görünmektedir. Bununla birlikte, serumun içerdiği büyüme faktörü miktarı görece az olsa da ileride yapılacak çalışmalarda daha tutarlı sonuçlar elde edilmesi için medyum içindeki BCS yüzdesinin azaltılması bir seçenek olarak durmaktadır. Hücre migrasyonu deneylerinde sıklıkla tercih edilen metotlar ise iki hücre grubu arasında boşluk oluşturan bir insert kullanılmasıyla gerçekleştirilen, hücrelerin belirli bir kemoatraktan algılayarak fiziksel bir bariyerden ona doğru göç etme yeteneğinin analiz edilmesi ve hücrelere yara açılması ile gerçekleştirilen, hücrelerin göçü ile yarayı kapatma yeteneklerinin ölçülmesi metodudur [111]. Yara açma yöntemi, temel ekipman gerektirdiğinden daha erişilebilir bir yöntemdir ve diğer metotlar ile kıyaslandığında hücre göçü analizinin daha basit bir yoludur. Bununla birlikte, 3T3-

L1 preadiposit hücrelerinde yara açma yöntemi ile migrasyon analizi yapılan çalışma sayısı oldukça azdır. Literatürde yara açıklığı modeli ile 3T3-L1 hücrelerinde yapılmış iki çalışma bulunmaktadır [112, 113]. Bunun nedeni olasılıkla 3T3-L1 hücrelerinin yara açılırken daha kolay zarar görebilmeleri ya da tutundukları yerden ayrılmalarında artış görülmesi olabilir. Yukarıda belirtilen bu faktörler nedeni ile 3T3-L1 hücrelerinin migrasyon deneylerinde çoğunlukla insert kullanılarak migrasyon değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda tez bütçesinin insert kullanımına izin vermeyecek düzeyde olması nedeni ile yara açma yöntemi ile migrasyon analizi yapıldı. Bulgulara göre, hücrelere 24 saat boyunca apigenin ve/ veya niklozamid uygulanması migrasyonda anlamlı bir farka yol açmadı. Hücrelere 48 saat boyunca 2,5 ve 5 μ M konsantrasyonda apigenin uygulandığında migrasyonda anlamlı bir artış gözlemlendi. Ancak 10 μ M apigenin uygulanması hücre migrasyonu üzerine anlamlı bir etki göstermedi. Ek olarak niklozamidin tek başına uygulanması da migrasyonda anlamlı bir artışa sebep oldu. Hücrelere niklozamid ön uygulaması apigeninin 2,5 ve 5 μ M konsantrasyonda uygulanmasının hücre migrasyonunu artırıcı etkisini ortadan kaldırdı. Hücrelere 72 saat boyunca niklozamid varlığında ya da yokluğunda apigenin uygulandığında, apigenin 5 μ M grubunda migrasyonda anlamlı bir artış gözlemlendi. Preadipositler polar yapıda, uzun, ince iğsi görünümde fibroblastik hücrelerdir. Fibroblastların migrasyon özelliklerinin bulunduğu bilinmektedir. Yara iyileşmesi inflamasyon, proliferasyon ve fibroblastlar vb. birçok hücre çeşidinin göçü gibi hücrelerel olaylarla gerçekleşmektedir. Fibroblastlar, yara iyileşmenin inflamasyon aşamasından onarımına kadar tüm süreçlerinde önemli rol oynar. Bu süreçte fibroblastlar büyüme faktörleri, sitokinler ve kollajen gibi bileşenler salgılayarak yara onarımı sürecine katkıda bulunur [114]. 3T3-L1 preadipositleri üzerinde yapılan bir çalışmada, hücre özellikleri ve morfolojik parametrelerinin migrasyon gibi hücrelerel olaylarda etkili olduğu bildirilmiştir [115] Aynı çalışmada, hücre şekli ve polarizasyonunun migrasyonda önemli rol oynadığı vurgulanmış ve preadipositlerin polarize olduğu ve yapılarının daha uzun olduğu; içi lipid dolu olgun adipositlerin ise daha yuvarlak, daha küçük olduğu ve bundan dolayı preadipositlerin olgun adipositlerden neredeyse 4 kat daha hızlı ve hareketli olduğu belirtilmiştir. Preadiposit hücrelerinin hız değerleri ise 20-100 mm/saat olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada preadipositlerin daha uzak mesafelere göç etme eğiliminde oldukları gözlemlenmiştir. Yağ doku üzerinde yapılan bir araştırmada, hücre iskeletinin ve hücre döngüsünün düzenlenmesi, adezyon, proliferasyon ve hücre göçü gibi hücrelerel olaylarda önemli rol oynayan kemokin bağımlı G protein aracılı reseptör ailesi üyesi bir alfa kemokin reseptörü olan CXCR4 reseptörünün bloke edilmesi durumunda yağ dokudan preadiposit serbestleşmesinin arttığı ve preadiposit hücrelerinin migrasyonunda bir artış olduğu gözlemlenmiştir [116]. Buna ek olarak farklı mekanizmaların preadiposit migrasyonuna yol açabileceği gösterilmiştir. 3T3-L1 preadipositlerinde yapılan bir çalışmada birçok hücre tipinde eksprese edilen ve gelişme, farklılaşma ve ölüm gibi hücrelerel fonksiyonlarda rol alan purinerjik reseptörlerden biri olan P2Y

reseptörünün aktivasyonunun, hücre migrasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, konjenital lipodistrofi, edinse lipodistrofi gibi hastalıklarda ve HIV tedavisinde kullanılan proteaz inhibitörlerine bağlı olarak gelişen lipodistrofide de vücut yağ dağılımının belirgin şekilde değiştiği bilinmektedir [117]. Bu tablolarda adipoz doku kütlelerinin azalmasının yanı sıra anormal dağılımı ve daha önce yağ dokusu bulunmayan bölgelerde ektopik yağ doku oluşumu görülmektedir. [118]. Ek olarak, adiposit prekürsörlerinin adipoz dokudan iskelet kasına göçüyle gelişen ve iskelet kasında lipid birikimi ile sonuçlanan sarkopenik obezitede benzer şekilde yağ dokunun dağılımı belirgin olarak değişmektedir [116]. Ayrıca yaşlılıkta deri altı yağ doku kitlesinin azaldığı, visceral yağ doku kitlesinin arttığı da bilinmektedir. Yağ doku kitle artışının adiposit hipertrofisi yanı sıra preadiposit diferansiyasyonu yolu ile de olabileceği gösterilmiştir. Yeni yağ doku oluşumunun ilk aşamasında preadipositlerin yağ doku hücre kümelerine doğru migrate olup ardından diferansiye oldukları gösterilmiştir [119]. Bu bilgiler ışığında yağ doku stromasındaki preadipositlerin uygun uyaranlar geldiğinde migrate olabilecekleri düşünülebilir. Hücre migrasyonunda rol oynayan önemli aktörlerden birisi Wnt sinyal yolağıdır. Wnt sinyal yolağının farklı hücre tiplerinde hücre migrasyonunu modüle ettiği gösterilmiştir. Hepatokarsinom hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, çeşitli hücresel olaylarda rol oynayan Wnt sinyal yolağının inhibisyonu, hücre migrasyonunu baskılamıştır ve bu etkiyi hücre proliferasyonunu baskılayarak yaptığı düşünülmüştür [120]. Bir başka çalışmada, kolon kanseri hücrelerinde, Wnt sinyal yolunun baskılanması, apoptozu indüklemiştir, hücrelerin proliferasyonunu ve göçünü engellemiştir [121]. Bu bilgilere göre, hücre migrasyonu genellikle hücre proliferasyonu ile paralel sonuçlar göstermiştir. Ek olarak, Wnt sinyal yolağının 3T3-L1 preadiposit hücre migrasyonu üzerindeki etkilerini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, diğer hücre tiplerinde migrasyon üzerine etkileri göz önüne alındığında, preadipositlerin migrasyonuna da karışıyor olabileceği akla gelmektedir. Bizim çalışmamızda apigeninin 5 µM konsantrasyonda hücre kültür ortamında bulunmasının 48 ve 72'inci saat ölçümlerinde yara kapanma oranında anlamlı bir artışa yol açması ve Wnt inhibitörü niklozamid ön uygulamasının bu artışı ortadan kaldırması birlikte değerlendirildiğinde 3T3-L1 hücrelerinde apigeninin hücre migrasyonu üzerine etkisinin Wnt sinyal yolağı aktivasyonu ile olabileceği olası görülmektedir. Bununla birlikte apigeninin migrasyonu artırıcı etkisinin 24 saatlik uygulamada görülmemesi ve apigenin 10 µM konsantrasyonda uygulanmasında yara kapanma oranında bir artışa yol açmamış olması bu sonuçların güvenilirliği hakkında sorulara neden olmaktadır. Ancak hücre kültürü deneyleri total olarak ele alındığında bu durumu açıklayabilmek mümkün gibi görülmektedir. Viabilite deneyleri sırasında apigeninin 10 µM konsantrasyonda uygulanmasının viabiliteyi bir miktar azalttığı ancak bu azalmanın anlamlı olmadığı görülmüştür. Bunun yanı sıra proliferasyon deneylerinde de yine 10 µM konsantrasyonda apigenin uygulamasının 0-2 ve 0-4'üncü gün aralığında proliferasyonu anlamlı olarak azalttığı da göz önüne alındığında, söz konusu

konsantrasyonun olasılıkla proliferasyonun baskılanmasının yanı sıra viabilitedeki bir miktar azalmanın da katkısı ile migrasyonun baskılanmasına yol açabileceği akla gelmektedir. Bunun yanı sıra ilginç bir bulgu olarak, ön uygulama sonrasında apigeninin hücre migrasyonunu artırıcı etkisini ortadan kaldırdığı görülen niklozamidin tek başına uygulandığında 48 saatin bitiminde alınan ölçümde migrasyonda artışa yol açması da düşündürücüdür. Niklozamid, 72 saatlik uygulama sırasında migrasyonda bir artışa yol açmakla birlikte bu artış anlamlı bulunmamıştır. Wnt yolağının inhibisyonunun hücre migrasyonunu artırdığı varsayımının kabul edilmesi durumunda ön uygulama ile Wnt inhibisyonu yapılmasının apigeninin yol açtığı hücre migrasyonundaki artışı ortadan kaldırmış olması çelişkili görünmektedir. Bununla birlikte, başlangıç yara açıklığı ölçüleri değerlendirildiğinde tek başına niklozamid uygulanan kuyucuklarda yara açıklığının diğer gruplara göre belirgin şekilde geniş olduğu görülmüştür. Olasılıkla niklozamidin tek başına uygulandığında yara kapanma oranının yüksek bulunmasında bu durumun da katkısı bulunmaktadır.

Niklozamid, insanlarda parazitik enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan antihelmintik bir ilaçtır. Niklozamidin, tenyalarda oksidatif fosforilasyondan sorumlu enzimleri baskılayarak enerjisiz kalmalarına neden olur. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise, niklozamidin, kanser, Tip 2 diyabet, metabolik hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi farklı hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceğini göstermiştir [122]. Niklozamidin bu etkilerine aracılık eden çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Örneğin, meme kanseri hücreleri üzerinde yapılan bir araştırmada, niklozamid uygulamasının mTORC1 sinyalini baskılayarak antitümör etkinlik gösterdiği gözlenmiştir [123]. Ek olarak yumurtalık kanseri hücrelerine uygulanan niklozamid, Wnt/ β -katenin sinyal yolağını inhibe ederek antikanser etkinlik göstermiştir [124]. Ayrıca, yapılan bir çalışmada, niklozamid uygulamasının STAT3, AKT ve Wnt/ β -katenin sinyal yollarını inhibe ederek sistemik skleroz hastalığının iyileşmesine katkıda bulunduğu gözlenmiştir [125]. Ek olarak, niklozamidin suda daha iyi çözünebilen bir formu olan niklozamid etanolamin tuzunun, tip 2 diyabetli farelerde uygulanmasının, metabolik semptomları azalttığı, enerji harcamasını ve lipid oksidasyonunu artırdığı, açlık kan şekeri ve insülin konsantrasyonlarının artışı önlediği gözlenmiştir [126]. Fakat altında yatan mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu bağlamda, çeşitli mekanizmaları etkileyerek farklı etkiler gösterebilen niklozamidin, bu çalışmada gözlenen bulgularını, Wnt sinyal yolağının dışında farklı mekanizmalar üzerinden de yapmış olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızın tüm bulguları ele alındığında, antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser ve potansiyel antiadipojenik etkileri bulunan bir flavonoid olan apigeninin 3T3-L1 preadipositlerine 10 μ M konsantrasyonunda uygulanması, diferansiyasyon sürecinin 0-4, 4-8 ve 0-8'inci zaman aralıklarında hücrelerin diferansiyasyonunu baskıladı. Ek olarak, hücrelere diferansiyasyonun

önemli bir aşaması olan proliferasyonun 0-2, 2-4 ve 0-4'üncü günleri aralığında 10 μ M apigenin uygulandığında ise, 0-2 ve 0-4'üncü günler aralığında proliferasyonun baskılandığı gözlemlendi. Ayrıca apigenin bu etkileri hücre canlılığını azaltmadan gösterdi. Hücre göçünün değerlendirildiği deney serilerinde apigenin, 48 ve 72 saat boyunca 5 μ M konsantrasyonda uygulandığında migrasyonda artışa sebep oldu. Apigeninin bu etkileri, diferansiyasyon sürecinde aktive olan belirli transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu ya da bazı sinyal yollarını baskılayarak yaptığı düşünüldü. Apigeninin migrasyonu artırmasının ise, hücrelerin morfolojik özelliklerinden kaynaklı olabileceği düşünüldü. Ek olarak, apigenin hücrelere Wnt sinyal yolu inhibitörü olan niklozamid ile kombine bir şekilde uygulandığında, antiproliferatif ve antiadipojenik etkileri ve migrasyonu arttırıcı etkisi ortadan kalktı. Bu bulgular bize, apigeninin bu etkilerini Wnt sinyal yolu üzerinden yapmış olabileceğini düşündürdü. Bu çıkarımların doğrulanabilmesi için ve apigeninin obeziteye karşı güvenilir bir ajan olarak kullanılabilmesi için çeşitli transkripsiyon faktörlerinin, reseptörlerin ve Wnt sinyal yolu proteinlerinin ölçümü yapılması gerekmektedir. Fakat çalışmamızda madde ve malzeme kısıtlılığından dolayı ve laboratuvar ortamımız yetersiz olduğu için sonuçlara göre oluşturduğumuz varsayımlar doğrulanamamıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Ricci-Cabello, I., Herrera, M. O., & Artacho, R. (2012). Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutrition reviews*, 70(4), 241–255.
- [2] Torres-Fuentes, C., Schellekens, H., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). A natural solution for obesity: bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. *Nutritional neuroscience*, 18(2), 49–65.
- [3] Ansari, S., Haboubi, H., & Haboubi, N. (2020). Adult obesity complications: challenges and clinical impact. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*, 11, 2042018820934955.
- [4] Cefalu, W. T., Bray, G. A., Home, P. D., Garvey, W. T., Klein, S., Pi-Sunyer, F. X., Hu, F. B., Raz, I., Van Gaal, L., Wolfe, B. M., & Ryan, D. H. (2015). Advances in the Science, Treatment, and Prevention of the Disease of Obesity: Reflections From a Diabetes Care Editors' Expert Forum. *Diabetes care*, 38(8), 1567–1582.
- [5] Mayer, M. A., Höcht, C., Puyó, A., & Taira, C. A. (2009). Recent advances in obesity pharmacotherapy. *Current clinical pharmacology*, 4(1), 53–61.
- [6] Yun J. W. (2010). Possible anti-obesity therapeutics from nature--a review. *Phytochemistry*, 71(14-15), 1625–1641.
- [7] Andersen, C., Rayalam, S., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2010). Phytochemicals and adipogenesis. *BioFactors (Oxford, England)*, 36(6), 415–422.
- [8] de Winter, T. J. J., & Nusse, R. (2021). Running Against the Wnt: How Wnt/ β -Catenin Suppresses Adipogenesis. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 627429.
- [9] Lazar A. D., Dinescu S., Costache M. (2018). Adipose tissue engineering and adipogenesis – a review. *Rev. Biol. Biomed. Sci* 1 17–26.
- [10] Jang, Y. J., Son, H. J., Choi, Y. M., Ahn, J., Jung, C. H., & Ha, T. Y. (2017). Apigenin enhances skeletal muscle hypertrophy and myoblast differentiation by regulating Prmt7. *Oncotarget*, 8(45), 78300–78311.
- [11] Pan, F. F., Shao, J., Shi, C. J., Li, Z. P., Fu, W. M., & Zhang, J. F. (2021). Apigenin promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and accelerates bone fracture healing via activating Wnt/ β -catenin signaling. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 320(4), E760-E771.

- [12] Sevimli M., Semerci Sevimli T. (2016). Embriyonik Kök Hücrelerde Wnt Sinyal Yolağı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi; 30(1): 45-54.
- [13] Mu, F., Huang, J., Xing, T., Jing, Y., Cui, T., Guo, Y., Yan, X., Li, H., & Wang, N. (2019). The Wnt/ β -Catenin/LEF1 Pathway Promotes Cell Proliferation at Least in Part Through Direct Upregulation of miR-17-92 Cluster. *Frontiers in genetics*, 10, 525.
- [14] Perrott, K. M., Wiley, C. D., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2017). Apigenin suppresses the senescence-associated secretory phenotype and paracrine effects on breast cancer cells. *GeroScience*, 39(2), 161–173.
- [15] Andersen, C., Rayalam, S., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2010). Phytochemicals and adipogenesis. *BioFactors* (Oxford, England), 36(6), 415–422.
- [16] Xu, M., Wang, S., Song, Y. U., Yao, J., Huang, K., & Zhu, X. (2016). Apigenin suppresses colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion via inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Oncology letters*, 11(5), 3075–3080.
- [17] Javed, Z., Sadia, H., Iqbal, M. J., Shamas, S., Malik, K., Ahmed, R., Raza, S., Butnariu, M., Cruz-Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2021). Apigenin role as cell-signaling pathways modulator: implications in cancer prevention and treatment. *Cancer cell international*, 21(1), 189.
- [18] Kitahara, C. M., Flint, A. J., Berrington de Gonzalez, A., Bernstein, L., Brotzman, M., MacInnis, R. J., Moore, S. C., Robien, K., Rosenberg, P. S., Singh, P. N., Weiderpass, E., Adami, H. O., Anton-Culver, H., Ballard-Barbash, R., Buring, J. E., Freedman, D. M., Fraser, G. E., Beane Freeman, L. E., Gapstur, S. M., Gaziano, J. M., ... Hartge, P. (2014). Association between class III obesity (BMI of 40-59 kg/m²) and mortality: a pooled analysis of 20 prospective studies. *PLoS medicine*, 11(7), e1001673.
- [19] Jensen, M. D., Ryan, D. H., Apovian, C. M., Ard, J. D., Comuzzie, A. G., Donato, K. A., Hu, F. B., Hubbard, V. S., Jakicic, J. M., Kushner, R. F., Loria, C. M., Millen, B. E., Nonas, C. A., Pi-Sunyer, F. X., Stevens, J., Stevens, V. J., Wadden, T. A., Wolfe, B. M., Yanovski, S. Z., Jordan, H. S., ... Obesity Society (2014). 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation*, 129(25 Suppl 2), S102–S138.
- [20] Hales, C. M., Carroll, M. D., Fryar, C. D., & Ogden, C. L. (2020). Prevalence of Obesity and Severe Obesity Among Adults: United States, 2017-2018. *NCHS data brief*, (360), 1–8.
- [21] Erem C. Prevalence of Overweight and Obesity in Turkey, (2015). *IJC Metabolic & Endocrine*, 8:38-41, ISSN 2214-7624.

- [22] Timmis, A., Townsend, N., Gale, C., Grobbee, R., Maniadakis, N., Flather, M., Wilkins, E., Wright, L., Vos, R., Bax, J., Blum, M., Pinto, F., Vardas, P., & ESC Scientific Document Group (2018). European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *European heart journal*, 39(7), 508–579.
- [23] Smith, K. B., & Smith, M. S. (2016). Obesity Statistics. *Primary care*, 43(1), 121–ix.
- [24] Hopkins, M., & Blundell, J. E. (2016). Energy balance, body composition, sedentariness and appetite regulation: pathways to obesity. *Clinical science (London, England : 1979)*, 130(18), 1615–1628.
- [25] Omer T. The causes of obesity: an in-depth review. *Adv Obes Weight Manag Control* 2020;10(3):90-94.
- [26] Lubrano, C., Genovesi, G., Specchia, P., Costantini, D., Mariani, S., Petrangeli, E., Lenzi, A., & Gnassi, L. (2013). Obesity and metabolic comorbidities: environmental diseases?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 640673.
- [27] Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., Beguinot, F., & Miele, C. (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2358.
- [28] Resi, V., Basu, S., Haghiac, M., Presley, L., Minium, J., Kaufman, B., Bernard, S., Catalano, P., & Hauguel-de Mouzon, S. (2012). Molecular inflammation and adipose tissue matrix remodeling precede physiological adaptations to pregnancy. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 303(7), E832–E840.
- [29] Kang, J. G., & Park, C. Y. (2012). Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes & metabolism journal*, 36(1), 13–25.
- [30] Heinonen, S., Jokinen, R., Rissanen, A., & Pietiläinen, K. H. (2020). White adipose tissue mitochondrial metabolism in health and in obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 21(2), e12958.
- [31] Meldrum, D. R., Morris, M. A., & Gambone, J. C. (2017). Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will?. *Fertility and sterility*, 107(4), 833–839.
- [32] Hall, J. E., do Carmo, J. M., da Silva, A. A., Wang, Z., & Hall, M. E. (2015). Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circulation research*, 116(6), 991–1006.

- [33] Seidell, J. C., & Halberstadt, J. (2015). The global burden of obesity and the challenges of prevention. *Annals of nutrition & metabolism*, 66 Suppl 2, 7–12.
- [34] Lauby-Secretan, B., Scoccianti, C., Loomis, D., Grosse, Y., Bianchini, F., Straif, K., & International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group (2016). Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. *The New England journal of medicine*, 375(8), 794–798.
- [35] Wang, F., & Xu, Y. (2014). Body mass index and risk of renal cell cancer: a dose-response meta-analysis of published cohort studies. *International journal of cancer*, 135(7), 1673–1686.
- [36] Genkinger, J. M., Spiegelman, D., Anderson, K. E., Bernstein, L., van den Brandt, P. A., Calle, E. E., English, D. R., Folsom, A. R., Freudenheim, J. L., Fuchs, C. S., Giles, G. G., Giovannucci, E., Horn-Ross, P. L., Larsson, S. C., Leitzmann, M., Männistö, S., Marshall, J. R., Miller, A. B., Patel, A. V., Rohan, T. E., Smith-Warner, S. A. (2011). A pooled analysis of 14 cohort studies of anthropometric factors and pancreatic cancer risk. *International journal of cancer*, 129(7), 1708–1717.
- [37] Li, L., Gan, Y., Li, W., Wu, C., & Lu, Z. (2016). Overweight, obesity and the risk of gallbladder and extrahepatic bile duct cancers: A meta-analysis of observational studies. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 24(8), 1786–1802.
- [38] Munsell, M. F., Sprague, B. L., Berry, D. A., Chisholm, G., & Trentham-Dietz, A. (2014). Body mass index and breast cancer risk according to postmenopausal estrogen-progestin use and hormone receptor status. *Epidemiologic reviews*, 36(1), 114–136.
- [39] Bandera, E. V., Qin, B., Moorman, P. G., Alberg, A. J., Barnholtz-Sloan, J. S., Bondy, M., Cote, M. L., Funkhouser, E., Peters, E. S., Schwartz, A. G., Terry, P., & Schildkraut, J. M. (2016). Obesity, weight gain, and ovarian cancer risk in African American women. *International journal of cancer*, 139(3), 593–600.
- [40] Ligibel, J. A., Basen-Engquist, K., & Bea, J. W. (2019). Weight Management and Physical Activity for Breast Cancer Prevention and Control. *American Society of Clinical Oncology educational book*. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 39, e22–e33.
- [41] Tee, M. C., Cao, Y., Warnock, G. L., Hu, F. B., & Chavarro, J. E. (2013). Effect of bariatric surgery on oncologic outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Surgical endoscopy*, 27(12), 4449–4456.
- [42] Tremmel, M., Gerdtham, U. G., Nilsson, P. M., & Saha, S. (2017). Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. *International journal of environmental research and public health*, 14(4), 435.

- [43] Yusefzadeh H, Rashidi A, Rahimi B. (2019). Economic burden of obesity: a systematic review *Soc Health Behav.*;2:7-12.
- [44] Dobbs R, Sawers C, Thompson F, Manyika J, Woetzel JR, Child P, McKenna S, Spatharou A. (2014). *Overcoming Obesity: An Initial Economic Analysis* McKinsey Global Institute
- [45] Musi, N., & Guardado-Mendoza, R. (2014). Adipose Tissue as an Endocrine Organ. In *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, 229-237.
- [46] Heinonen, S., Jokinen, R., Rissanen, A., & Pietiläinen, K. H. (2020). White adipose tissue mitochondrial metabolism in health and in obesity. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 21(2), e12958.
- [47] Elagizi, A., Kachur, S., Lavie, C. J., Carbone, S., Pandey, A., Ortega, F. B., & Milani, R. V. (2018). An Overview and Update on Obesity and the Obesity Paradox in Cardiovascular Diseases. *Progress in cardiovascular diseases*, 61(2), 142–150.
- [48] Birsoy, K., Festuccia, W. T., & Laplante, M. (2013). A comparative perspective on lipid storage in animals. *Journal of cell science*, 126(Pt 7), 1541–1552.
- [49] Nielsen, T. S., Jessen, N., Jørgensen, J. O., Møller, N., & Lund, S. (2014). Dissecting adipose tissue lipolysis: molecular regulation and implications for metabolic disease. *Journal of molecular endocrinology*, 52(3), R199–R222.
- [50] Galsgaard, K. D., Pedersen, J., Knop, F. K., Holst, J. J., & Wewer Albrechtsen, N. J. (2019). Glucagon Receptor Signaling and Lipid Metabolism. *Frontiers in physiology*, 10, 413.
- [51] Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Frontiers in endocrinology*, 7, 30.
- [52] Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell*, 156(1-2), 20–44.
- [53] Fenzl, A., & Kiefer, F. W. (2014). Brown adipose tissue and thermogenesis. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 19(1), 25–37.
- [54] Richard, A. J., White, U., Elks, C. M., & Stephens, J. M. (2020). Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction. In K. R. Feingold (Eds.) et. al., *Endotext*. MDText.com, Inc.
- [55] Wang, C., Liang, X., Tao, C., Yao, X., Wang, Y., Wang, Y., & Li, K. (2017). Induction of copper and iron in acute cold-stimulated brown adipose tissues. *Biochemical and biophysical research communications*, 488(3), 496–500.

- [56] Mota de Sá, P., Richard, A. J., Hang, H., & Stephens, J. M. (2017). Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Comprehensive Physiology*, 7(2), 635–674.
- [57] van Marken Lichtenbelt W. (2012). Brown adipose tissue and the regulation of nonshivering thermogenesis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 15(6), 547–552.
- [58] Oelkrug, R., Polymeropoulos, E. T., & Jastroch, M. (2015). Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 185(6), 587–606.
- [59] Carpentier, A. C., Blondin, D. P., Virtanen, K. A., Richard, D., Haman, F., & Turcotte, É. E. (2018). Brown Adipose Tissue Energy Metabolism in Humans. *Frontiers in endocrinology*, 9, 447.
- [60] Connell, N. J., Doligkeit, D., Andriessen, C., Kornips-Moonen, E., Bruls, Y. M. H., Schrauwen-Hinderling, V. B., van de Weijer, T., van Marken-Lichtenbelt, W. D., Havekes, B., Kazak, L., Spiegelman, B. M., Hoeks, J., & Schrauwen, P. (2021). No evidence for brown adipose tissue activation after creatine supplementation in adult vegetarians. *Nature metabolism*, 3(1), 107–117.
- [61] Cinti S. (2012). The adipose organ at a glance. *Disease models & mechanisms*, 5(5), 588–594.
- [62] Stanford, K. I., Middelbeek, R. J., & Goodyear, L. J. (2015). Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes*, 64(7), 2361–2368.
- [63] Tran, T. T., & Kahn, C. R. (2010). Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nature reviews. Endocrinology*, 6(4), 195–213.
- [64] da Cunha de Sá-Caputo, D., Souza, A., Coelho-Oliveira, A. C., Pessanha-Freitas, J., Reis, A. S., Francisca-Santos, A., Dos Anjos, E. M., Paineiras-Domingos, L. L., de Rezende Bessa Guerra, T., da Silva Franco, A., Xavier, V. L., Barbosa E Silva, C. J., Moura-Fernandes, M. C., Mendonça, V. A., Rodrigues Lacerda, A. C., da Rocha Pinheiro Mulder, A., Seixas, A., Sartorio, A., Taiar, R., & Bernardo-Filho, M. (2021). Evaluation of the Relationships between Simple Anthropometric Measures and Bioelectrical Impedance Assessment Variables with Multivariate Linear Regression Models to Estimate Body Composition and Fat Distribution in Adults: Preliminary Results. *Biology*, 10(11), 1209.
- [65] Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., & Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366–376.

- [66] Lukaszewski, M. A., Eberlé, D., Vieau, D., & Breton, C. (2013). Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 305(10), E1195–E1207.
- [67] Mulya, A., & Kirwan, J. P. (2016). Brown and Beige Adipose Tissue: Therapy for Obesity and Its Comorbidities?. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 45(3), 605–621.
- [68] Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C. M., & Guertin, D. A. (2016). Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. *Trends in cell biology*, 26(5), 313–326.
- [69] Ibrahim M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 11(1), 11–18.
- [70] Fasshauer, M., & Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends in pharmacological sciences*, 36(7), 461–470.
- [71] Farkhondeh, T., Llorens, S., Pourbagher-Shahri, A. M., Ashrafizadeh, M., Talebi, M., Shakibaei, M., & Samarghandian, S. (2020). An Overview of the Role of Adipokines in Cardiometabolic Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(21), 5218.
- [72] Smekal, A., & Vaclavik, J. (2017). Adipokines and cardiovascular disease: A comprehensive review. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 161(1), 31–40.
- [73] Blüher, M., & Mantzoros, C. S. (2015). From leptin to other adipokines in health and disease: facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism: clinical and experimental*, 64(1), 131–145.
- [74] Pereira S, Alvarez-Leite J. (2014). Adipokines: biological functions and metabolically healthy obese profile. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*, 7:15-25.
- [75] Coelho, M., Oliveira, T., and Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of Medical Science*, 9, 191–200.
- [76] Schling, P., and Löffler, G. (2018). Cross talk between adipose tissue cells: impact on pathophysiology. *News Physiological Sciences*, 17, 99–104.
- [77] Ahmad, B., Serpell, C. J., Fong, I. L., & Wong, E. H. (2020). Molecular Mechanisms of Adipogenesis: The Anti-adipogenic Role of AMP-Activated Protein Kinase. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 76.

- [78] Scheja, L., Heeren, J. (2019). The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nature reviews. Endocrinology*, 15(9), 507–524.
- [79] Audano, M., Pedretti, S., Caruso, D., Crestani, M., De Fabiani, E., Mitro, N. (2022). Regulatory mechanisms of the early phase of white adipocyte differentiation: an overview. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 79(3), 139.
- [80] Bahmad, H. F., Daouk, R., Azar, J., Sapudom, J., Teo, J., Abou-Kheir, W., Al-Sayegh, M. (2020). Modeling Adipogenesis: Current and Future Perspective. *Cells*, 9(10), 2326.
- [81] Sarjeant, K., Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9), a008417.
- [82] Khalilpourfarshbafi, M., Gholami, K., Murugan, D. D., Abdul Sattar, M. Z., & Abdullah, N. A. (2019). Differential effects of dietary flavonoids on adipogenesis. *European journal of nutrition*, 58(1), 5–25.
- [83] Lefterova, M. I., & Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 20(3), 107–114.
- [84] Darlington, G. J., Ross, S. E., & MacDougald, O. A. (1998). The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 273(46), 30057–30060. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.46.30057>
- [85] Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Ribas V, Esteve E, Rodriguez-Hermosa JI, Ruiz B, Peral B, Ricart W, Zorzano A, Fernandez-Real JM. Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor- α 1 gene expression than omental fat. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17(12):2134–2141.
- [86] Chung, S. S, Lee, J. S, Kim, M, Ahn, B. Y, Jung, H. S, Lee, H. M, Kim, J. W, & Park, K. S. (2012). Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by CCAAT/enhancer binding protein β during adipogenesis. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 20(3), 482–487.
- [87] Zhou X, Wang F, Zhou R, Song X, Xie M. (2017). Apigenin: A current review on its beneficial biological activities. *Journal of Food Biochemistry*, 41(4):e12376.
- [88] Gawish M., Farouk R., Ramadan M., Mashaly H., Helmy H. (2016). Eco-Friendly Multifunctional Properties of Cochineal and Weld for Simultaneous Dyeing and Finishing of Proteinic Fabrics. *International Journal of Engineering and Technology*, 8, 2246-2253
- [89] Madunić, J., Madunić, I. V., Gajski, G., Popić, J., & Garaj-Vrhovac, V. (2018). Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. *Cancer letters*, 413, 11–22.

- [90] Yan, X., Qi, M., Li, P., Zhan, Y., & Shao, H. (2017). Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. *Cell & bioscience*, 7, 50.
- [91] Perrott, K. M., Wiley, C. D., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2017). Apigenin suppresses the senescence-associated secretory phenotype and paracrine effects on breast cancer cells. *GeroScience*, 39(2), 161–173.
- [92] Andersen, C., Rayalam, S., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2010). Phytochemicals and adipogenesis. *BioFactors (Oxford, England)*, 36(6), 415–422.
- [93] Ono, M., & Fujimori, K. (2011). Antiadipogenic effect of dietary apigenin through activation of AMPK in 3T3-L1 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 13346–13352.
- [94] Lien, W. H., & Fuchs, E. (2014). Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes & development*, 28(14), 1517–1532.
- [95] Longo, K. A., Wright, W. S., Kang, S., Gerin, I., Chiang, S., Lucas, P. C., et al. (2004). Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J. Biol. Chem.* 279, 35503–35509.
- [96] Yang, K., Wang, X., Zhang, H., Wang, Z., Nan, G., Li, Y., Zhang, F., Mohammed, M. K., Haydon, R. C., Luu, H. H., Bi, Y., & He, T. C. (2016). The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 96(2), 116–136.
- [97] Moon, J. S., Ko, H. M., Park, J. I., Kim, J. H., Kim, S. H., & Kim, M. S. (2018). Inhibition of human mesenchymal stem cell proliferation via Wnt signaling activation. *Journal of cellular biochemistry*, 119(2), 1670–1678.
- [98] Baksh, D., Boland, G. M., & Tuan, R. S. (2007). Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation. *Journal of cellular biochemistry*, 101(5), 1109–1124.
- [99] De Boer, J., Wang, H. J., & Van Blitterswijk, C. (2004). Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering*, 10(3-4), 393–401.
- [100] Dönmez H. G. , Demirezen Ş. , Beksac M. S. (2011). WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 25(3): 189-199.
- [101] Ören H. (2020). Kök Hücreler. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 33(3): 271-280.
- [102] Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J. et al. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Sig Transduct Target Ther* 7, 3.

- [103] Shantier, S., Garelnabi E., Gadkariem E. (2015), Stability Studies On Niclosamide Using Derivative Spectroscopic And Chromatographic Methods. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 122-132.]
- [104] Zebisch, K., Voigt, V., Wabitsch, M., & Brandsch, M. (2012). Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Analytical biochemistry*, 425(1), 88–90.
- [105] Hulkower, K. I., & Herber, R. L. (2011). Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics*, 3(1), 107–124.
- [106] Gyamfi, J., Lee, Y. H., Min, B. S., & Choi, J. (2019). Niclosamide reverses adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells via suppression of the interleukin-6/STAT3 signalling axis. *Scientific reports*, 9(1), 11336.
- [107] Arend, R. C., Londoño-Joshi, A. I., Samant, R. S., Li, Y., Conner, M., Hidalgo, B., Alvarez, R. D., Landen, C. N., Straughn, J. M., & Buchsbaum, D. J. (2014). Inhibition of Wnt/ β -catenin pathway by niclosamide: a therapeutic target for ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 134(1), 112–120.
- [108] Thomaz, F. M., de Jesus Simão, J., da Silva, V. S., Machado, M. M. F., Oyama, L. M., Ribeiro, E. B., Alonso Vale, M. I. C., & Telles, M. M. (2022). Ginkgo biloba Extract Stimulates Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(10), 1294.
- [109] Pei, H., Yao, Y., Yang, Y., Liao, K., & Wu, J. R. (2011). Krüppel-like factor KLF9 regulates PPAR γ transactivation at the middle stage of adipogenesis. *Cell death and differentiation*, 18(2), 315–327.
- [110] Pirkmajer, S., & Chibalin, A. V. (2011). Serum starvation: caveat emptor. *American journal of physiology. Cell physiology*, 301(2), C272–C279.
- [111] Monti M. (2019). Cell Migration - Methods and Protocols. *European journal of histochemistry : EJH*, 63(1), 3013.
- [112] Vaid, B., Chopra, B. S., Raut, S., Sagar, A., Badmalia, M. D., Ashish, & Khatri, N. (2020). Antioxidant and Wound Healing Property of Gelsolin in 3T3-L1 Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 4045365.
- [113] Alexander, H. R., Syed Alwi, S. S., Yazan, L. S., Zakarial Ansar, F. H., & Ong, Y. S. (2019). Migration and Proliferation Effects of Thymoquinone-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (TQ-NLC) and Thymoquinone (TQ) on *In Vitro* Wound Healing Models. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2019, 9725738.

- [114] Addis, R., Cruciani, S., Santaniello, S., Bellu, E., Sarais, G., Ventura, C., Maioli, M., & Pintore, G. (2020). Fibroblast Proliferation and Migration in Wound Healing by Phytochemicals: Evidence for a Novel Synergic Outcome. *International journal of medical sciences*, 17(8), 1030–1042.
- [115] Lustig, M., Zadka, Y., Levitsky, I., Gefen, A., & Benayahu, D. (2019). Adipocytes Migration is Altered Through Differentiation. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, 25(5), 1195–1200.
- [116] Favaretto, F., Bettini, S., Busetto, L., Milan, G., & Vettor, R. (2022). Adipogenic progenitors in different organs: Pathophysiological implications. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 23(1), 71–85.
- [117] Gao, C., & Mantzoros, C. (2015). Lipodystrophy Syndromes. *Endocrinology, Diabetes and Metabolism*.
- [118] Trujillo, M. E., & Scherer, P. E. (2005). Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *Journal of internal medicine*, 257(2), 167–175.
- [119] Omatsu-Kanbe, M., Inoue, K., Fujii, Y., Yamamoto, T., Isono, T., Fujita, N., & Matsuura, H. (2006). Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells. *The Biochemical journal*, 393(Pt 1), 171–180.
- [120] Kim, H.J., Park, S.Y., Park, O.J., & Kim, Y. (2013). Curcumin suppresses migration and proliferation of Hep3B hepatocarcinoma cells through inhibition of the Wnt signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 8, 282-286.
- [121] Piao, S. S., & Shang, B. (2019). Pizotifen Inhibits the Proliferation and Migration of Colon Cancer HCT116 Cells by Down-regulating Wnt Signaling Pathway. *Annals of clinical and laboratory science*, 49(2), 183–188.
- [122] Chen, W., Mook, RA, Jr, Premont, RT ve Wang, J. (2018). Niclosamide: Bir antihelminthic ilacın ötesinde. *Hücre sel sinyalleşme* , 41 , 89–96.
- [123] Wang, Y. C., Chao, T. K., Chang, C. C., Yo, Y. T., Yu, M. H., & Lai, H. C. (2013). Drug screening identifies niclosamide as an inhibitor of breast cancer stem-like cells. *PloS one*, 8(9), e74538.
- [124] Arend, R. C., Londoño-Joshi, A. I., Samant, R. S., Li, Y., Conner, M., Hidalgo, B., Alvarez, R. D., Landen, C. N., Straughn, J. M., & Buchsbaum, D. J. (2014). Inhibition of Wnt/ β -catenin pathway by niclosamide: a therapeutic target for ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 134(1), 112–120.

[125] Morin, F., Kavian, N., Nicco, C., Cerles, O., Chéreau, C., & Batteux, F. (2016). Niclosamide Prevents Systemic Sclerosis in a Reactive Oxygen Species-Induced Mouse Model. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 197(8), 3018–3028.

[126] Osada, T., Chen, M., Yang, X. Y., Spasojevic, I., Vandeusen, J. B., Hsu, D., Clary, B. M., Clay, T. M., Chen, W., Morse, M. A., & Lyster, H. K. (2011). Antihelminth compound niclosamide downregulates Wnt signaling and elicits antitumor responses in tumors with activating APC mutations. *Cancer research*, 71(12), 4172–4182.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Tuğçe COŞKUNCA

Doğum Tarihi :



E-mail :

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Beslenme ve Diyetetik	Lefke Avrupa Üniversitesi	2015-2019
Yüksek Lisans	Tıbbi Farmakoloji	Mersin Üniversitesi	2020-2023