

T.C
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

OBEZİTEYE BAĞLI OLARAK ORTAYA ÇIKAN DİYABETİ
MİMİK EDEN 3T3-L1 HÜCRE MODELİNDE
SAFRANAL'IN İNSÜLİN DUYARLILIĞI VE ADİPOZİT
KAHVERENGİLEŞMESİ İLE İLGİLİ MOLEKÜLER
MARKÖRLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
TRANSKRİPSİYONEL DÜZEYDE ANALİZİ

SİMGE TUTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2025
MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

SİMGE TUTAN tarafından hazırlanan **OBEZİTEYE BAĞLI OLARAK ORTAYA ÇIKAN DİYABETİ MİMİK EDEN 3T3-L1 HÜCRE MODELİNDE SAFRANAL'IN İNSÜLİN DUYARLILIĞI VE ADİPOZİT KAHVERENGİLEŞMESİ İLE İLGİLİ MOLEKÜLER MARKÖRLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN TRANSKRİPSİYONEL DÜZEYDE ANALİZİ** başlıklı tezinin, 24/06/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Hatice MERGEN (**Jüri Başkanı**)

İmza:

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı,
Hacettepe Üniversitesi, Ankara

Prof. Dr. Reşat ÜNAL (**Danışman**)

İmza:

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Mehmet VAROL (**Üye**)

İmza:

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Reşat ÜNAL

İmza:

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Reşat ÜNAL

İmza:

Danışman, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Filiz Altan

İmza:

İkinci danışman, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 24/06/2025

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

Simge TUTAN

24/06/2025



ETİK BEYAN METNİ

Kendi gerçekleştirdiğim araştırmanın bir sonucu olan ve Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazılan “Obeziteye Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Diyabeti Mimik Eden 3T3-L1 Hücre Modelinde Safranin’in İnsülin Duyarlılığı ve Adiposit Kahverengileşmesi ile İlgili Moleküler Markörler Üzerindeki Etkisinin Transkripsiyonel Düzeyde Analizi” başlıklı bu yüksek lisans tezinin planlanmasından yazımına kadar tüm süreçlerde etik ilkelere bağlı kaldığımı, tezime ilişkin bilgi ve belgeleri akademik ve bilimsel etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezimde kullandığım tüm görsel ve yazılı materyallerin kaynağını gösterdiğimi, yararlandığım eserlerin tümünün kaynaklar bölümünde yer aldığını ve tezde yapay zekâ (YZ) araçlarının kullanımına dair açıklamaların aşağıda belirttiğim şekilde olduğunu beyan ederim.

YAPAY ZEKÂ (YZ) KULLANIMINA DAİR BEYANNAME

1. Tez çalışmasının hiçbir bölümünde YZ araçlarının kullanılmadığı durumlarda aşağıdaki beyan istenir.

☒ Bu tez çalışması kapsamında herhangi bir YZ aracı kullanmadığımı beyan ederim.

2. Tez çalışmada YZ araçlarının kullanıldığı durumlarda aşağıdaki beyan istenir.

☐ Tezin bazı bölümlerini düzenlemek için aşağıdaki tabloda belirttiğim bölümlerde YZ aracı kullandığımı beyan ederim. Kullandığım YZ araç (lar)ının isimleri, versiyonları, erişim tarihleri, çalışmanın hangi aşamasında kullanıldığı ve bağlantıları tezin “Yapay Zekâ (YZ) Kullanım Yöntemi” başlığıyla Yöntem kısmında verilmiştir. Ayrıca tezde aşağıda beyan ettiğim bölümlerde YZ kullanımı uygun atıf ve kaynak gösterimi ile de belirtilmiştir.

YZ KULLANIMINA DAİR BEYANNAME	
Tezin özet bölümünün gözden geçirilmesinde kullanılmıştır.	
Literatür taraması ve ilgili kaynakların bulunmasında kullanılmıştır.	
Araştırma hipotezi /hipotezlerin belirlenmesinde kullanılmıştır.	
Örneklem büyüklüğü tespiti/güç,analizi hesaplamasında kullanılmıştır.	
Veri toplamada kullanılmıştır.	
Veri depolamada kullanılmıştır.	
Verilerin istatistiksel analizi, görselleştirilmesi veya yorumlanmasında kullanılmıştır.	
Kaynakların istenen formata göre uygun olarak düzenlenmesinde ve doğrulanmasında kullanılmıştır.	
Dilbilgisi ve yazım kontrolünde kullanılmıştır.	
Akademik metinlerin çevirisi veya yabancı dilde ifadelerin kontrolü için kullanılmıştır.	
Tez başlığının belirlenmesi veya şekillendirilmesinde kullanılmıştır.	
Araştırma sorularının belirlenmesi veya optimize edilmesinde kullanılmıştır.	
Tablo, şekil veya grafik oluşturulmasında kullanılmıştır.	
İntihal ve benzerlik oranlarının kontrol edilmesinde kullanılmıştır.	
Anket veya mülakat sorularının oluşturulmasında kullanılmıştır.	
Diğer kullanımlar (açıklayınız).....	

24/06/ 2025

Simge TUTAN

BEYAN METNİ

(Toplumsal Katkı / Sürdürülebilir Kalkınma)

Yüksek lisans/doktora tezi olarak sunduğum “Obeziteye Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Diyabeti Mimik Eden 3T3-L1 Hücre Modelinde Safranal’ın İnsülin Duyarlılığı ve Adiposit Kahverengileşmesi ile İlgili Moleküler Markörler Üzerindeki Etkisinin Transkripsiyonel Düzeyde Analizi” başlıklı çalışmanın kapsamında yer alan Toplumsal Katkı ve Sürdürülebilir Kalkınma Temel Amaçları aşağıdaki tablolarda yer alan ilgili kısımlar işaretlenerek gösterilmiştir.

TOPLUMSAL KATKI	
Toplumun Öncelikli İhtiyaçlarının Belirlenmesi ve Analizi	
Topluma Katkı Sağlayan Bilimsel Araştırma ve Geliştirme Çalışmaları	X
Toplum İçin Eğitim, Bilgilendirme ve Farkındalık Çalışmaları	
Toplumun Öncelikli Sorunlarına Yönelik Bilimsel ve Yenilikçi Çözümler	X
Toplum İçin Kamu, Özel Sektör ve Sivil Toplum Kuruluşları Gibi Paydaşlarla İş Birliği	
Yerel, Ulusal ve Küresel Tarihi ve Kültürel Değerlere Katkı	
Toplum Yararına Yürütülen Sosyal Sorumluluk ve Kültürel Etkinlikler	
Diğer (açıklayınız).....	

SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA TEMEL AMAÇLARI	
Amaç 1: Yoksulluğa Son	
Amaç 2: Açlığa Son	
Amaç 3: Sağlık ve Kaliteli Yaşam	X
Amaç 4: Nitelikli Eğitim	
Amaç 5: Toplumsal Cinsiyet Eşitliği	
Amaç 6: Temiz Su ve Sanitasyon	
Amaç 7: Erişilebilir ve Temiz Enerji	
Amaç 8: İnsana Yakışır İş ve Ekonomik Büyüme	
Amaç 9: Sanayi, Yenilikçilik ve altyapı	
Amaç 10: Eşitsizliklerin Azaltılması	
Amaç 11: Sürdürülebilir Şehirler ve Topluluklar	
Amaç 12: Sorumlu Üretim ve Tüketim	
Amaç 13: İklim Eylemi	
Amaç 14: Sudaki Yaşam	
Amaç 15: Karasal Yaşam	
Amaç 16: Barış, Adalet ve Güçlü Kurumlar	
Amaç 17: Amaçlar İçin Ortaklıklar	
Diğer (açıklayınız).....	

24/06/ 2025

Simge TUTAN

ÖZET

OBEZİTEYE BAĞLI OLARAK ORTAYA ÇIKAN DİYABETİ MİMİK EDEN 3T3-L1 HÜCRE MODELİNDE SAFRANAL'IN İNSÜLİN DUYARLILIĞI VE ADİPOZİT KAHVERENGİLEŞMESİ İLE İLGİLİ MOLEKÜLER MARKÖRLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN TRANSKRİPSİYONEL DÜZEYDE ANALİZİ

Simge TUTAN

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Reşat ÜNAL

İkinci (Ortak) Danışman: Doç. Dr. Filiz ALTAN

Haziran 2025, 90 sayfa

Obezite, bireyin günlük olarak aldığı ve harcadığı enerji miktarları arasındaki dengesizliğe bağlı olarak ortaya çıkan başta insülin direnci ve diyabet olmak üzere birçok metabolik hastalığın oluşumuna neden olan bir rahatsızlıktır. Diyabet ise insülin salgısında meydana gelen bir aksaklıktan, dokular tarafından insüline verilen yanıtın azalmasından yani dokuların insüline karşı duyarsızlaşmasından veya her iki süreçte meydana gelen durumlar neticesinde ortaya çıkan kandaki şeker miktarında artış ile ilişkilendirilen metabolik hastalıklardan biridir. Birbiriyle yakından bağlantılı olan bu iki hastalığın dünyadaki prevalansı oldukça yüksektir hatta pandemi olarak nitelendirilebilecek boyutlara hızla ilerlemektedir. Bu rahatsızlıklar sebebiyle ise her gün binlerce insan sağlık kuruluşlarına başvurmaktadır ve bu durum da sağlık sistemi üzerinde önemli bir yük oluşturmaktadır ek olarak bu rahatsızlık kişilerin günlük hayatlarını da zorlaştırmaktadır. Bu rahatsızlıkların tedavisi adına insülin duyarlılığını artırmak ve adipositlerin kahverengileşmesini sağlamak önemli mekanizmalar olarak görülmektedir. Bu sebeple bu mekanizmaların regülasyonunu sağlayacak aynı zamanda aktivasyonlarını indükleyecek yöntemlerin, bitkilerin, bileşiklerin vb. düzenleyicilerinin keşfedilmesi önem arz etmektedir. Tıbbi bitki ve bileşiklerinin kullanımı ise düşük maliyet, yan etkilerinin az olması ve güvenilirlikleri nedeniyle çalışmalarda tercih edilebilirliklerini artırmaktadır. Safranal safrana özgü karakteristik yapının oluşmasını sağlayan aromatik bileşiktir ve yapılan çalışmalarda safranal'in antioksidan, anti-kanser, anti-mikrobiyal vb. özellikleri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada öncelikle 3T3-L1 hücre hattının büyütülmesi ve farklılaştırılması ile istenilen modelin sağlanması, sonrasında sırasıyla RNA izolasyonu, cDNA sentezi yapılması, qPCR ile insülin duyarlılığı ve adiposit kahverengileşmesi ile ilgili olan mtHSP70, UCP-1, GLUT-4, PGC-1 α markörlerinin transkripsiyonel düzeyde analizi

işlemleri gerçekleştirilmiştir. Böylelikle safranal'in insülin duyarlılığı ve adiposit kahverengileşmesi üzerine olan etkisinin literatüre kazandırılması ve diğer çalışmalar için kaynak oluşturulması aynı zamanda alternatif bir tedavi veya önleyici bir seçenek sunmak amaçlanmıştır. Sonuçlar ele alındığında safranalin mtHSP70 ile NF-kb yolu üzerinden antienflamatuvar bir etki göstererek insülin duyarlılığını iyileştirdiği aynı zamanda mitokondriyal biyogeneze katkı gösterdiği anlaşılmıştır. Safranalin uygulamasıyla beraber istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmemesine rağmen hem 24 hem de 48 saat uygulamasının GLUT-4'ün mRNA ekspresyon seviyelerinin arttırma yönünde teşvik ettiğini, UCP-1 ve PGC-1 α için ise 48 saat uygulamasının mRNA ekspresyon seviyelerinin arttırma yönünde teşvik ettiği görülmüştür. Safranalin gösterdiği bu etkinin moleküler anlamda nasıl olarak gerçekleştiğini anlamak ve yorumlamak için farklı genler ve metotların kullanıldığı daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Adipoz Doku, Kahverengileşme, İnsülin Duyarlılığı, Safranalin

ABSTRACT

TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF THE EFFECT OF SAFRANAL ON MOLECULAR MARKERS RELATED TO INSULIN SENSITIVITY AND ADIPOCYTE BROWNING IN A 3T3-L1 CELL MODEL THAT MIMICS OBESITY-INDUCED DIABETES

Simge TUTAN

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Reşat ÜNAL

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Filiz ALTAN

June 2025, 90 pages

Obesity is a disorder that causes the formation of many metabolic diseases, especially insulin resistance and diabetes, which occur due to the imbalance between the amount of energy that the individual takes and spends daily. Diabetes, on the other hand, is one of the metabolic diseases associated with an increase in the amount of sugar in the blood that occurs as a result of a disruption in insulin secretion, a decrease in the response to insulin by the tissues, that is, the desensitization of the tissues to insulin, or the conditions that occur in both processes. The prevalence of these two diseases, which are closely related to each other, is quite high in the world, and it is rapidly advancing to dimensions that can be described as a pandemic. Due to these ailments, thousands of people apply to health institutions every day, which creates a significant burden on the health system, in addition, this ailment complicates people's daily lives. Increasing insulin sensitivity and browning of adipocytes are seen as important mechanisms for the treatment of these disorders. For this reason, it is important to discover methods that will regulate these mechanisms and at the same time induce their activation, plants, compounds, etc. The use of medicinal plants and their compounds, on the other hand, increases their preference in studies due to their low cost, low side effects and reliability. Safranal is the aromatic compound that provides the formation of the characteristic structure unique to saffron, and studies have shown that safranal has antioxidant, anti-cancer, anti-microbial, etc. properties. In this study, firstly, the desired model was achieved by growing and differentiating the 3T3-L1 cell line, followed by RNA isolation, cDNA synthesis, transcriptional analysis of mtHsp70, UCP-1, GLUT-4, PGC-1 α markers related to insulin sensitivity and adipocyte browning by qPCR, respectively.

Thus, it is aimed to bring the effect of safranal on insulin sensitivity and adipocyte browning to the literature, to create a source for other studies, and to provide an alternative treatment or preventive option. When the results were considered, it was understood that safranal improved insulin sensitivity by showing an anti-inflammatory effect through the NF-kb pathway with mtHSP70 and also contributed to mitochondrial biogenesis. Although statistically significant results were not obtained with safranal administration, it was observed that both 24 and 48 hours of application encouraged the increase of mRNA expression levels of GLUT-4, and 48 hours of application encouraged the increase of mRNA expression levels for UCP-1 and PGC-1 α . More studies using different genes and methods are needed to understand and interpret how this effect of saffron occurs in molecular terms.

Keywords: Diabetes, Safranal, Adipose Tissue, Insulin Sensitivity, Browning





Canım Abim ve Sevgili Aileme

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim süresince bursiyeri olduğum TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Programları Başkanlığı (BİDEB)'na 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında katkıları için teşekkür ederim.

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne tez süresince yapılan tüm çalışmaları 23/152/04/1/4 nolu araştırma projesi kapsamında destekledikleri için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, kıymetli bilgilerini paylaşmaktan kaçınmayan, bana değerli zamanını ayırıp büyük bir ilgi ve sabırla desteğini gösteren danışman hocam Prof. Dr. Reşat ÜNAL'a sonsuz teşekkür ederim. Kazandırdığı her şey için ve beni hep daha iyi yerlere taşıyacak bilgilerle doldurduğu için kendisine minnettarım.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde bilgisi ve tecrübesiyle yol gösteren, desteğini ve samimiyetini hiç esirgemeyen Doç. Dr. Filiz ALTAN hocama çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olduğu, anlayışı ve desteği için canım dostum Deniz AYTAÇ'a sonsuz teşekkürler. Deney planlarından laboratuvarında yaptığımız sohbetlere, başarının mutluluğundan belirsizliğin kaygısına kadar her anı birlikte yaşadık. Bu yolculuğu onunla paylaşmak benim için paha biçilemezdi. Bilime ve hayata dair paylaştığımız bu yolculuk tez çalışmasının en değerli yanlarından biri oldu.

Beraber çalışmaktan inanılmaz zevk aldığım, desteğini her zaman hissettiğim, deney süreçleri sayesinde hayatıma giren ve hep hayatımda olmasını istediğim canım çalışma arkadaşım Aleya Ezgi ÇELİK'e çok teşekkür ederim.

Bu tez, ailemden aldığım koşulsuz desteğin, sonsuz sevginin ve sarsılmaz güvenin bir ürünüdür. Eğitim yolculuğumda beni her anlamda destekleyen bu hayattaki en büyük şansım canım aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	x
İÇİNDEKİLER	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Crocus sativus</i> L.....	1
1.1.1. Safranın bileşenleri	1
1.1.1.1. <i>Safranal</i>	2
1.1.1.2. <i>Pikrokrosin</i>	4
1.1.1.3. <i>Krosin</i>	5
1.2. İnsülin Duyarlılığı	5
1.3. Diabetes mellitus.....	6
1.3.1. Tip 1 Diyabet.....	7
1.3.2. Tip 2 Diyabet.....	7
1.3.3. Gestasyonel diyabet	9
1.4. Adipoz Doku	9
1.4.1. Kahverengi adipoz doku	11
1.4.2. Beyaz adipoz doku	12
1.4.3. Bej adipoz doku.....	13
1.5. Adiposit Kahverengileşmesi	13
1.6. Markörler.....	15
1.6.1. 18S	15
1.6.2. UCP-1.....	16
1.6.3. GLUT-4.....	17
1.6.4. PGC-1 α	18
1.6.5. PPAR- γ	19
1.6.6. mtHSP70	19
1.6.7. mtHSP60	20
1.6.8. C/EBP- α	21
2. MATERYAL VE METOT	22
2.1. Materyal	22
2.1.1. Safranal bileşiğinin temin edilmesi.....	22
2.1.2. 3T3-L1 Hücre hattı.....	22
2.1.3. Kimyasal materyaller	22
2.1.4. Primerler.....	24
2.2. Metot	25
2.2.1. Safranal ara stok hazırlanması	25
2.2.2.1. <i>Hücrelerin çözülmesi</i>	26
2.2.2.2. <i>Hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanması</i>	26

2.2.2.3. Hücrelerin dondurulması	27
2.2.2.4. Hücrelerin diferansiasyonu	28
2.2.3. Safranal'ın hücrelerde toksik olmayan konsantrasyonunun belirlenmesi	29
2.2.3.1. 24-well plate gözleme dayanan toksisite çalışmaları	29
2.2.3.2. 96-well plate safranal uygulaması ve MTT testi	30
2.2.4. Hücrelerden RNA izolasyonu	32
2.2.5. Oil Red O boyama	33
2.2.6. RNA miktarının ve kalitesinin belirlenmesi	34
2.2.6.1. Spektrofotometrik deneyler	34
2.2.6.2. Agaroze jel elektroforezi	34
2.2.7. cDNA sentezi	35
2.2.8. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) deneyleri	36
2.2.9. RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi	38
3. BULGULAR	39
3.1. Hücre Kültürü Çalışmalarına Dair Bulgular	39
3.1.1. Hücrelerin çözülmesi, büyütülmesi ve pasajlanması	39
3.1.2. Hücrelerin dondurulması ve saklanması	41
3.1.3. Hücrelerin farklılaştırılması	41
3.2. Safranal Bileşiğinin Uygulanabilmesi İçin Hücrelerde Toksik Olmayan Konsantrasyonun Belirlenmesi Çalışmasına Ait Bulgular	42
3.2.1. 24-well plate gözleme dayalı test sonuçlarına ait bulgular	43
3.2.2. MTT testine ait bulgular	45
3.3. Oil Red O Boyamasına Ait Sonuçlar	46
3.4. RNA İzolasyonu Sonuçları	47
3.4.1. Spektrofotometrik analiz sonuçları	47
3.4.2. RNA Örneklerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi	49
3.5. Real Time Kantitatif PCR (qPCR) Sonuçları	50
3.5.1. MtHSP70 geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi	51
3.5.2. UCP-1 geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi	53
3.5.3. CEBP- α geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi	56
3.5.4. PGC-1 α geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi	56
3.5.5. GLUT-4 geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi	59
3.5.6. PPAR- γ geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi	61
3.5.7. mtHSP60 geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi	62
4. TARTIŞMA	63
5. SONUÇ	70
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	90

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kimyasallar	23
Çizelge 2.2. Primerler	24
Çizelge 2.3. cDNA Sentezi için kullanılan maddeler ve miktarları	36
Çizelge 2.4. RT-PCR reaksiyonu için kullanılan maddeler ve miktarları.....	37
Çizelge 2.5. RT-PCR deney protokolü	37
Çizelge 3.1. RNA'nın μ Drop analiz sonuçları.....	48



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Hücrelerin çözöldükten birkaç saat sonraki görüntüleri (4x büyütme)	39
Şekil 3.2. Hücrelerin çözöldükten birkaç gün sonraki görüntüleri (4x büyütme).....	40
Şekil 3.3. Pasajlama yapılan hücrelerin görüntüleri (10x büyütme).....	40
Şekil 3.4. Sıvı nitrojene kaldırılan hücreler ait görüntüler	41
Şekil 3.5. Diferansiyasyon sonrası hücrelere ait görüntüler (sırasıyla 20x, 10x ve 40x büyütme)	42
Şekil 3.6. Safranal'e 24 saat maruz kalmış hücrelere ait görüntüler (10x büyütme) .	43
Şekil 3.7. Safranal'e 48 saat maruz kalmış hücrelere ait görüntüler (10x büyütme) .	44
Şekil 3.8. Safranal'e 72 saat maruz kalmış hücrelere ait görüntüler (10x büyütme) .	44
Şekil 3.9. İlk MTT testi sonucu elde edilen grafik.....	45
Şekil 3.10. İkinci MTT testi sonucu elde edilen grafik.....	45
Şekil 3.11. Üçüncü MTT testi sonucu elde edilen grafik.....	46
Şekil 3.12. Farklılaştırılmış hücrelere sırasıyla kontrol, 2.5 µM ve 5 µM olmak üzere 24 saat safranal uygulaması sonrası yapılan boyamalar sonucu elde edilen görüntüler (Tüm görüntüler 40x büyütme ile alınmıştır)	46
Şekil 3.13. Farklılaştırılmış hücrelere sırasıyla kontrol, 2.5 CM ve 5 µM olmak üzere 48 saat safranal uygulaması sonrası yapılan boyamalar sonucu elde edilen görüntüler (Tüm görüntüler 40x büyütme ile alınmıştır)	47
Şekil 3.14. 2.set 24 saate ait agaroz jel görüntüleri.....	50
Şekil 3.15. 2.set 48 saate ait agaroz jel görüntüleri.....	50
Şekil 3.16. MtHSP70 primerine ait erime sıcaklığı eğrisi	51
Şekil 3.17. Safranal'e 24 saat maruz bırakılan hücrelere ait MtHSP70 geni erime sıcaklığı eğrisi.....	51
Şekil 3.18. Safranal'e 48 saat maruz bırakılan hücrelere ait MtHSP70 geni erime sıcaklığı eğrisi.....	52
Şekil 3.19. MtHSP70 geni qPCR analiz sonuçları	53
Şekil 3.20. UCP-1 primerine ait erime sıcaklığı eğrisi	54
Şekil 3.21. Safranal'e 24 saat maruz bırakılan hücrelere ait UCP-1 geni erime sıcaklığı eğrisi.....	54
Şekil 3.22. Safranal'e 48 saat maruz bırakılan hücrelere ait UCP-1 geni erime sıcaklığı eğrisi.....	55
Şekil 3.23. UCP-1 geni qPCR analiz sonuçları.....	56
Şekil 3.24. PGC-1α primerine ait erime sıcaklığı eğrisi	57
Şekil 3.25. Safranal'e 24 saat maruz bırakılan hücrelere ait PGC-1α geni erime sıcaklığı eğrisi	57

Şekil 3.26. Safranal'e 48 saat maruz bırakılan hücrelere ait PGC-1 α geni erime sıcaklığı eğrisi	57
Şekil 3.27. PGC-1 geni qPCR analiz sonuçları.....	58
Şekil 3.28. GLUT-4 primerine ait erime sıcaklığı eğrisi	59
Şekil 3.29. Safranal'e 24 saat maruz bırakılan hücrelere ait GLUT-4 geni erime sıcaklığı eğrisi	59
Şekil 3.30. Safranal'e 48 saat maruz bırakılan hücrelere ait GLUT-4 geni erime sıcaklığı eğrisi	60
Şekil 3.31. GLUT-4 geni qPCR analiz sonuçları.....	61
Şekil 3.32. PPAR- γ primerine ait erime sıcaklığı eğrisi	61



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μg	mikrogram
μl	mikrolitre
μM	mikromolar
ADP	Adenozin Difosfat
AKT	Protein Kinaz B
ATP	Adenozin Trifosfat
CAT	Katalaz
c-EBP- α	CCAATT/Güçlendirici Bağlayıcı Protein- α
CO_2	Karbondioksit
CT	Treshold Cycle
ddH ₂ O	Otoklavlanmış distile su
Tip 2 DM	Tip 2 Diabetes Mellitus
DM	Diferensiyasyon Medium/Farklılaşma Ortamı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
EtBr	Ethidium Bromide
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF21	Fibroblast growth factor 21
GLUT 4	Glukoz Taşıyıcı Tip 4
GM	Büyüme Mediumu/Büyüme Ortamı
GSH	Glutasyon
HbA1C	Hemoglobin A1C
HLA	Human Leukocyte Antigen
IBMX	Isobütilmetilksantin
IL-1 β	Interleukin-1 Beta
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
kg	Kilogram
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
mg	miligram
ml	mililitre
mm	milimetre

mtHSP-70	Mitokondriyal HSP70
mtHSP-60	Mitokondriyal HSP60
MTT	3- (4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür
Myf5	Myogenic Factor 5
NCS	Newborn Calf Serum
NO	Nitrik Oksit
NOD	Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
Pax7	Paired-box 7
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PGC-1 α Koaktivatör-1	Peroksizom Proliferatörüyle Aktifleştirilen Reseptör- γ
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
rpm	revolutions per minute
TAE	Tris Asetikasit EDTA
Tbx1	T-box Transcription Factor
Tmem26	Transmembrane Protein 26
TNF- α	Tumor necrosis factor
UCP-1	Uncoupling Protein 1
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

1.1. *Crocus sativus* L.

Safran, *Crocus sativus* L. çiçeklerinin dişicik tepesinin kurutulmasıyla elde edilir ve dünyanın en pahalı baharatlarından biri olarak bilinir. Iridaceae familyasına aittir ve antik çağlardan bu yana türlü türlü hastalıkları tedavi etmek amacıyla ilaç olarak, yemekleri lezzetlendirmek adına baharat olarak, kumaş başta olmak üzere çeşitli maddeleri boyamak amacıyla boyar madde olarak kullanılmaktadır (Ghorbani ve Koochehi, 2017).

Çok yıllık bir bitkidir, kurak ve yarı kurak olarak nitelendirilebilecek alanlarda yetiştirilir. Soğuk kış aylarında, bol yağış alan ilkbahar ve sonbaharda, yazın ise düşük yağış alan bölgelerde fazlaca yetişir. Aynı zamanda kumlu ve killi topraklarda iyi yetişir. Derin yeşil yapraklar, çiçekler ve 3-5 cm çaplarında yuvarlak soğanlardan oluşur. Çiçekler 6 taç yapraklıdır, çiçekte üç stamen vardır. Çiçek aynı zamanda bir stilus ve 3 iplik stigmaya sahiptir. Stigmalar gelişim ile beyazdan kırmızıya dönüşür. Stigmalar bitkinin ticari olarak anlam ifade eden kısmıdır ve geri kalan ise çiçeksel biyokütle olarak adlandırılır. Safran çiçekleri asimetric mayoz nedeniyle kısırdır ve verimli tohumlar oluşturamazlar. Yetiştirilmesi insan eli ile manuel olarak ekiminin yapılmasıyla mümkün olmaktadır (Bakshi vd., 2022; Halvorson, 2008; Winterhalter ve Straubinger, 2000). Yetiştirilmesinin zorluğu ve yetiştirilme sonrası elde edilen ürünün azlığı nedeniyle safran oldukça pahalı bir baharattır. Safranın piyasa değeri yalnızca verimi ile ölçülmez aynı zamanda kalitesi ile de ölçülür. Safranın kalitesi, üç ana ikincil metabolit tarafından belirlenir.

1.1.1. Safranın bileşenleri

Safran, kemoterapötik, anti-enflamatuvar, anti-diyabetik ve antioksidan özelliklere sahip yaklaşık olarak 150 fitokimyasala sahiptir. Fitokimyasallar insanlarda tedavi amaçlı çeşitli özellikleri bulunan biyoaktif bileşenlerdir. Safranın içeriğinde bulunan ana bileşenler krosin, safranal, pikrokrosin, kaempferol, naringenin, taksifolin,

likopen, zeaksantin ve tiamin'dir (José Bagur vd., 2017). Bu ana bileşenlerden üç tanesi safranın ikincil metabolitidir ve safranın karakteristik özelliklerinin oluşumuna katkı sağlar.

Bu ikincil metabolitlerden biri krosindir ve kimyasal formülü $C_{44}H_{64}O_{24}$ 'tür. Suda çözünebilir bir yapıya sahiptir ve safranın karakteristik parlak sarı renginin oluşumundan sorumludur. Bu ikincil metabolitlerden bir diğeri pikrokrosindir ve kimyasal formülü $C_{16}H_{26}O_7$ 'dir. Safranalin öncüsü olan monoterpen glikozit özelliği gösteren yani safranalin oluşumu ve duyuşal özelliklerinin gelişimine katkı sağlayan moleküldür. Acı tadın oluşumunu sağlar. Safran kurutulduktan sonra safranal adı verilen uçucu bir bileşiğe dönüşür ve aromasını oluşturur. Kaliteyi etkileyen bu ikincil metabolitlerden bir başkası ise safranaldır ve kimyasal formülü $C_{10}H_{14}O$ 'dur. Esansiyel yağda en fazla bulunan bileşendir ve karakteristik aromanın oluşumdan sorumludur (Cardone vd., 2019).

Safranın tat, koku ve aromasının oluşumunda rol oynayan ikinci metabolitler safranın sadece kalitesini ve buna bağlı olarak piyasa değerinin belirlenmesinde rol oynamaz aynı zamanda sağlık üzerine gösterdiği olumlu etkileri ve tıbbi değerinin oluşumunu da belirler (Carmona vd., 2006). İkincil metabolitler bitkilerin aroması, tadı ve rengini oluşturmak üzere birincil metabolitlerden türer. Bitkinin bulunduğu coğrafi özellikler yani bitkinin bulunduğu bölgenin sıcaklığı, aldığı yağış miktarı, rakımı ve toprak özellikleri ikincil metabolitlerin üretimini etkileyebilir. Bu etkileme ikincil metabolitlerin üretiminin artması şeklinde olur çünkü ikincil metabolitler bitkinin bulunduğu çevreye uyum sağlaması için de işlev gösterir. Ek olarak bitkinin patojenlere karşı korunmasında da görev alır (Parizad vd., 2019).

1.1.1.1. Safranal

Safranın uçucu fraksiyonu 40'tan fazla bileşik içerir. Bu bileşiklerden en önemlisi safranın karakteristik aromasına katkıda bulunan safranal (2,6,6-trimetil-1,3-sikloheksadien-1-karboksaldehit, $C_{10}H_{14}O$) bileşigidir. Safranal pikrokrosinin aglikonudur yani pikrokrosinin parçalanması sonrası pikrokrosinden şekerin ayrılması sonucu elde edilen bileşiktir. Bu durumda elde edilen bileşik safranaldır. Pikrokrosin iki basamaklı enzimatik-dehidrasyon yöntemi ile veya doğrudan termal degradasyonla safranale çevrilir. Safran içerisinde safranal konsantrasyonu %0,1–%0,6 aralığında

değişmektedir. Gaz kromatografisi ile yapılan çalışmalarda dünyanın en kaliteli safranı olarak değerlendirilen safranın toplam uçucu bileşiğinin içerisinde safranalin %65 veya daha fazla oranda bulunduğu belirlenmiştir (Moratalla-López vd., 2019). Safran, safran esansiyel yağında en fazla miktarda bulunan bileşiktir. Aynı zamanda safran uçucu fraksiyonun yaklaşık %60-70'ine tekabül eder. Safranın karakteristik aroması ve dolayısıyla safran, yeni toplanan stigmalarda mevcut değildir. Daha sonrasında depolamayla beraber stigmalarda gerçekleşen enzimatik ve termal bozulma ile safranalin üretimi gerçekleşir. Yapılan bir çalışma da yüksek sıcaklıkların ve daha kısa işleme sürelerinin safran miktarını arttırdığını göstermiştir (Rezaee ve Hosseinzadeh, 2013; Himeno ve Sano 1987). Safran, ile ilgili literatürde yapılmış çokça çalışma vardır. Yapılan bu çalışmalarda safranalin kaygı giderici, uyku düzenleyici ve antidepresan özellikler sergilediği bildirilmiştir (Hosseinzadeh ve Noraei, 2009; Liu vd., 2012). Yapılan bir çalışmada yaşlı sıçanlara bir ay boyunca her gün düzenli olarak intraperitoneal olarak 0,5 mg/kg konsantrasyonlarda safran enjekte edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde safranalin yaşa bağlı olarak gelişen oksidatif hasarı ve antioksidan savunma sistemini iyileştirdiği bildirilmiştir. Buradan hareketle safranalin tıpkı bir antioksidan gibi hareket ettiği ve anti-enflamatuvar etkiler sergilediği gösterilmiştir. Daha sonrasında yapılan daha fazla çalışma ile bu etkiler kanıtlanmıştır (Farahmand vd., 2013; Alayunt vd., 2019). Yapılan çalışmalar ile safranalin metabolik hastalıklar üzerinde de iyileştirici etkisinin olduğu gösterilmiştir. Örneğin bir çalışmada alloxan ile oluşturulmuş diyabetli farelere altı hafta boyunca oral yolla 0.25 ml/kg/gün ve 0.5 ml/kg/gün dozlarında safran uygulaması yapılmış. Uygulamanın ardından farelerin açlık kan şekeri, hemoglobin A1c (HbA1c) seviyeleri, insülin seviyeleri ve bazı diğer parametreler ölçülmüş. Elde edilen sonuçlarda ise farelerin kan insülin seviyelerinin iyileştiğini, açlık kan şekeri ve hemoglobin A1c seviyelerinin anlamlı bir şekilde düştüğü tespit edilmiştir. Diğer bazı parametrelerde ise bir değişiklik görülmemiştir (Kianbakht ve Hajiaghazadeh, 2011).

Yapılan diğer çalışmalar sonrasında safranalin anti-diyabetik etkisinin anti-oksidan ve anti-enflamatuvar aktivitesiyle ilişkili olabileceği bu nedenle anti-diyabetik bir etki göstermiş olabileceği düşünülmüştür. Yapılan başka bir çalışmada ise diyabetli fareler kullanılmış ve sırasıyla 0.25, 0.50, 0.75 mg/kg/gün olacak şekilde safran uygulanmış. Uygulama sonrasında ölçülen NO, kan şekeri, kolesterol ve trigliseritlerin safran ile anlamlı bir şekilde düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Oksidatif ajanlar olan

GSH, CAT ve NOD üzerine etkilerini doz bağımlı olarak gösterdiği bulunmuştur (Samarghandian vd., 2013). Başka bir çalışmada ise safranalin sadece diyabet ve oksidatif ajanlar üzerine etki göstermekle kalmayıp aynı zamanda diyabete bağlı gelişen komplikasyonlardan biri olan diyabetik nöropatinin tedavisi üzerine de etki gösterdiği anlaşılmıştır. Bu çalışmada diyabetli farelere 1 mg/kg dozda safranal insülinle kombinasyon halinde verilmiş. Tedavi sonrası safranalin kan şekerini düzenlemekle kalmayıp bununla beraber diyabetik nöropatiyi anti-oksidan, anti-hiperglisemik ve anti-apoptatik etkiler ile tedavi ettiği gösterilmiştir (Farshid ve Tamaddonfard, 2015). Başka bir çalışma da ise safranalin oksidatif stres ve enflamasyon üzerine etkilerini incelemek adına farelerde yüksek yağlı diyet ve streptozotosin ile diyabet indüklenmiş. Ve böylelikle safranalin diyabete bağlı gelişen komplikasyonları hafifletebileceği gibi proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β seviyelerinin de anlamlı olarak düşürüldüğü bildirilmiştir (Hazman ve Ovalı, 2015).

Safranal ile yukarı belirlenenler ve çok daha fazlası olmak üzere çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda safranalin birçok özelliği keşfedilmiş ve literatüre kazandırılmıştır. Ancak literatürde yer alan çalışmalarda safranalin etkisi diyabet ve obezite çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir hücre hattı olan 3T3-L1 hücre hattında gösterilmemiş olup safranalin kahverengileşme veya insülin duyarlılığı üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışma da bulunmamaktadır. 3T3-L1 hücre hattı fare hücrelerinden elde edilmiştir ve genetik olarak stabil özellik gösterir bu nedenle izole edilmiş adipositlere kıyasla çalışmalarda kullanımı daha kolaydır (Poulos vd., 2010).

1.1.1.2. Pikrokrosin

Pikrokrosin (4-(β -D-glukopiranoziloksi)-2,6,6-trimetil-1-sikloheksen-1 karboksaldehit, C₁₆H₂₆O₇), safranin acı tadını oluşturan bileşiktir. Bu bileşik sadece Crocus cinsinde bulunmuştur. Bu sebeple, pikrokrosin, safranin bir belirtici olma özelliği gösterir aynı zamanda safrana özgü diğer baharatlarda bulunmayan kendine has tadının oluşumuna katkı sağlar. Safranin kurutulmuş stigmalarında pikrokrosin oranı %7–%16 arasında olup bu yüzde daha da fazla olabilmektedir (Moratalla-López vd., 2019; del Campo vd., 2010). Yapılan bir çalışmada insan kanser hücrelerinde pikrokrosin uygulamasıyla beraber kanser hücrelerinde anti-

proliferatif aktivitenin gerçekleştiği bildirilmiştir. Ancak bu etki doza bağlı olarak gerçekleşmektedir (Kyriakoudi vd., 2015).

1.1.1.3. Krosin

Krosin ($C_{20}H_{24}O_4$), safranın karakteristik parlak renginin oluşumundan sorumludur. Safranda bulunan krosetin, toplam içeriğin %16-%28'ine denk gelir ve bazı durumlarda bu oran daha da fazla olabilir (Heaney vd., 2018). Yapılan alışmalar ile krosinin özellikle serbest radikal temizleyici, Sitotoksik, anti-trombosit, nefroprotektif, antidepresan, antioksidan ve antienflamatuvar etkileri olduğu gösterilmiştir (Erben-Russ vd., 1987; Rezaee ve Hosseinzadeh, 2013; Kocaman vd., 2019; Hatziagapiou vd., 2019).

1.2. İnsülin Duyarlılığı

Besin metabolizması, metabolizma ile ilişkili birçok yolun düzenlenmesini gerektiren bir organizmanın hayatta kalması, büyümesi ve gelişmesi için geren temel yoldur. İnsülin ise 51 amino asitten oluşan bir peptit hormonu olup; karbonhidrat, lipit, protein metabolizmasını insülin reseptörleri, insülin reseptör substratları, PI3K ve AKT'yi de içeren sinyal iletim yolları aracılığıyla koordine eder (Haeusler vd., 2018).

İnsülin direnci, adipositler ve miyositler gibi insüline duyarlı hücrelerin bulunduğu dokularda, insülin hormonuna karşı verilen yanıtın normal olmaması olarak tanımlanabilen patolojik bir durumdur. İnsülin direnci endoplazmik retikulum stresi, mitokondriyal disfonksiyon, enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun artması gibi birçok kompleks olay tarafından indüklenir. İnsülin direnci tip 2 diyabet başta olmak üzere çeşitli metabolik bozuklukların gelişimine neden olur (Samuel ve Shulman, 2016). İnsülin duyarlılığı ise hücrelerin insüline karşı duyarsızlaşması yani ortamda insülin bulunsa dahi sinyal iletiminin gerçekleşmemesi bu nedenle kan şeker seviyelerinin dşrlememesi olarak tanımlanabilir. İnsülin direnci ile insülin duyarlılığı arasında negatif korelasyon vardır. Bu nedenle insülin duyarlılığında meydana gelen azalma ile spesifik dokularda substrat olarak glukozun hücre içine alınması engellenir veya azalır. İnsülin duyarlılığındaki bu azalma sinyal iletiminde aksamaya ve buna bağlı olarak insülin direncinin gelişimine aynı zamanda biyolojik

işlevlerde bozulmalara ve birçok metabolik rahatsızlığın gelişimine neden olur (Yaribeygi vd., 2019).

İnsülin sinyal iletim yolu insülinin yanıt veren hücrelerde bulunan insülin reseptörlerine bağlanmasıyla başlar. Bu resepsiyonla beraber insülin reseptör substratlarının tirozin kalıntıları üzerinde fosforilasyonu tetiklenir. Aktive olan insülin reseptör substratı, PI3Kinazı aktive eder ve böylelikle sinyal kaskadının ilerlemesini indükleyerek sinyal iletiminin gerçekleşmediği durumda sitoplazmada bulunan glukoz transporter 4'ün plazma membranına hareketini ve böylelikle kanda bulunan glukozun hücre içine alınmasını ve kan şeker seviyelerinin düzenlenmesini yönetir (Wang vd., 1999). Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) sinyal iletim molekülleri, metabolik homeostaz ve insülin duyarlılığının düzenlenmesinde işlev görür (Asano vd., 2007).

İnsülin duyarlılığında meydana gelen azalma ile insülin sinyal iletim yolunda aksaklık meydana gelir. Olması gerektiği gibi işlev gösteremeyen bu yolak nedeniyle kan şeker seviyeleri yüksek kalır. Eğer bu durum metformin vb. insülin duyarlılığını artırıcı ajanlar veya beslenme düzeninin değiştirilmesi gibi faktörler ile düzene sokulmazsa insülin direncinin gelişimi ve sonrasında tip 2 diyabet başta olmak üzere diğer metabolik rahatsızlıkların gelişimi söz konusu olur (Naresh vd., 2012).

1.3. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus, kronik olarak seyreden hiperglisemi ana semptomu olan (kan şeker seviyesinin yüksek olması) heterojen metabolik bozukluklar için kullanılan bir kavramdır. Bozulmuş bir insülin salgısı, bozulmuş insülin etkisi veya her iki durumla birden karakterize bir durumdur. Halk arasında şeker hastalığı olarak bilinir. Diabetes mellitus tanısı koyulurken ölçülen değişkenler: Venöz plazma glukozu değeri, açlık plazma glukozu, OGTT (oral glukoz tolerans testi) venöz plazmada, HbA1c (hemoglobin A1c)'dir. Diyabet durumunda anormal derecede yüksek bozulmuş açlık glukoz seviyeleri ve bozulmuş glukoz toleransı görülmektedir (Petersmann vd., 2019).

Diyabet temelde 4 kategoriye ayrılabilir bunlar:

1. Tip 1 diyabet (β -hücrelerinin tahribatına bağlı insülin üretiminin kesinlikle olmadığı diyabet)

2. Tip 2 diyabet (insülin direncine ek olarak devam eden bir insülin salgısı bozukluğu olan diyabet)
3. Gestasyonel diyabet (gebelikle beraber gelişen diyabet)
4. Monojenik (tek gen mutasyonu) diyabet sendromları, ekzokrin pankreas hastalıkları (kistik fibröz) gibi başka sebeplerle gelişen diyabet türleri de mevcuttur (Anonim, 2015).

1.3.1. Tip 1 diyabet

Diyabetin bir türü olan tip 1 diyabet, toplam diyabet vakalarının önemli bir kısmını oluşturur. Tip 1 diyabetin en belirgin özelliği insülin eksikliğidir. Hastalara hızlı, kısa, orta ve uzun etkili gibi farklı türlerde eksojen insülin kullanılarak şeker seviyelerinin yönetilmesi sağlanır. Bu sebeple, tip 1 diyabet aynı zamanda insüline bağımlı diyabet diye de bilinir (Li ve Gao, 2017).

Tip 1 diyabet tanısı, pankreatik adacık otoimmünitesinden kaynaklanan insülin eksikliği olan bireylere koyulmaktadır. β -hücrelerine yapılan bu immün atakta rol oynayan moleküller antijene özgü oto-reaktif T hücreleri ve düzenleyici T hücreleri olarak tanımlanabilir. Tip 1 diyabet β -hücre anormalliklerinden kaynaklanır bu anormallikler, HLA aşırı eksprese edilmesi (insan lökosit antijeni) ve protein yanlış katlanması bu nedenle neoantijen oluşumu olarak sayılabilir (Redondo ve Morgan, 2023).

1.3.2. Tip 2 diyabet

Tip 2 Diyabet, en fazla görülen metabolik bozukluklardan biri olup tüm diyabet vakalarının %90'ından fazlasını oluşturur. Pankreatik β hücrelerinden kaynaklanan bozulmuş insülin salgılanması ve insüline duyarlı hücrelerin insüline uygun şekilde cevap verememesi gibi iki temel sorunun birleşimiyle meydana gelir. İnsülin sekresyonu ve uyarımı, glukoz metabolizmasının homeostazı için ihtiyaç duyulan mekanizmalar olduğundan; insülinin sentezi, salınımı ve bağlanması ile ilgili moleküler süreçler ciddi bir şekilde kontrol edilir. Bu süreçlerde yer alan herhangi bir düzeyde meydana gelen bozulmalar, tip 2 diyabetin de gelişmesine sebebiyet veren metabolik bozulmalara yol açabilir (Galicia-Garcia, 2020). Tip 2 diyabetin gelişimine

neden olan risk faktörleri; genetik, metabolik ve çevresel faktörleri içerir ve bu faktörler birbirleriyle etkileşimde bulunurlarsa hastalığın ortaya çıkma ihtimalide artmaktadır (Hu vd., 2001).

β -hücreleri glukoz homeostazında görevli insülinin üretilmesinden sorumlu olan pankreasta bulunan hücrelerdir ve tip 2 diyabet gelişimin de bozulmuş insülin sentezi görülmektedir. Bu hücreler tarafından, preproinsülin olarak bilinen ve insülin sentezinde ilk basamak olan insülin formunun üretimini sağlar. Henüz olgun bir formda olmayan bu insülin üretiminin ardından endoplazmik retikuluma gönderilir ve burada birtakım proteinler tarafından konformasyonel değişikliklere uğratılır. Bu değişiklikler sonucu preproinsülin artık proinsülin formunu alır. Ardından bu form endoplazmik retikulumdan golgiye taşınır ve burada olgunlaşmamış sekretuar veziküllere girerek C-peptit ve insülin olarak kesilir. İnsülin olgun formuna kavuştuktan sonra yüksek glukoz gibi durumlar ile sekresyonu tetiklenene kadar granüllerde depo edilir. Yüksek glukoz durumuna yanıt olarak salgılanmasının yanı sıra amino asitler, yağ asitleri veya hormonlar gibi bazı başka moleküllerde insülin sekresyonunu tetikleyebilir (Fu vd., 2013).

Obezite gibi aşırı beslenme durumunda hiperglisemi ve hiperlipidemi sıklıkla görülür, bu durum da insülin direncini, insülin duyarlılığının azalmasını ve kronik enflamatuvar yanıtı indükler. β -hücreleri, aşırı beslenme gibi birtakım tetikleyici koşullar altında, inflamasyon ve buna bağlı gelişen stres, endoplazmik retikulum stresi, metabolik/oksidatif stres vb. stres durumlarına tabi kalır ve nihai olarak adacık bütünlüğü bozulur ve hücre fonksiyonlarını kaybeder. Gelişen bu durum tip 2 diyabetin gelişmesinde rol oynayan temel mekanizmalardan biridir (Christensen ve Gannon, 2019).

Bu mekanizmaların dışında genetik, beslenme, fiziksel aktivite ve yaş gibi bazı durumlar altında tetiklenen; mitokondriyal fonksiyonların bozulması, insülin duyarlılığının azalması, adiposit biyolojisinde meydana gelen değişimler, enflamatuvar yanıt gibi mekanizmaların tip 2 diyabet gelişimine sebep olması söz konusudur. Tip 2 diyabet kronik düşük dereceli enflamatuvar bir hastalıktır. Bu kronik durum, monositler ve makrofajlarda IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1 ve diğer sitokinlerin daha fazla miktarlarda eksprese edildiği durumu ifade eder (Hotamışlıgil, 2006). Tip 1 diyabetin aksine, tip 2 diyabet heterojen ve karmaşıktır; sadece pankreası etkilemekle

kalmaz bunun yanında metabolik organları da etkileyen fazlaca patofizyolojik sürece sahiptir. Tip 2 diyabet kardiyovasküler hastalıkların gelişimi, diyabetik nefropati, diyabetik nöropati, non-alkolik steatohepatit ve diyabetik retinopatiden sorumludur (Demir vd., 2021).

1.3.3. Gestasyonel diyabet

Gebelik, insülin direnci ve hiperinsülinemi ile bağlantılıdır. Bu durum bazı kadınlarda diyabet gelişimine neden olabilir. Gestasyonel diyabet, gebelik sürecinde ortaya çıkan veya ilk kez fark edilen diğer diyabet türleri gibi glukozun tolere edilmediği bu nedenle kan şeker seviyesinin yüksek kaldığı diyabettir. Diyabetin bu şekilde tanımlanması, glukoz intoleransının daha gebelik durumu başlamadan gerçekleşebileceği gerçeğini inkâr etmez (Alfadhli, 2015).

1.4. Adipoz Doku

Enerjinin lipidler olarak depolanması, evrimsel süreç boyunca yüksek oranda korunmuş hem tek hücreli hem de çok hücreli organizmalar tarafından gerçekleştirilen bir olaydır. Prokaryotlar ve tek hücreli ökaryotlar, lipidleri lipid damlacıkları veya lipid cisimlerinde depolarken, çok hücreli organizmalar yani gelişmiş ökaryotik canlılar lipid depolamasını gerçekleştirebilmek için özel hücreler geliştirmiştir (Driskell vd., 2014; Ottaviani vd., 2011). Adipoz doku, aşırı beslenmesi sonrası vücutta bulunan fazla trigliseritlerin depolanması ve açlık durumunda depolanan bu trigliseritlerin salınmasını böylelikle enerjinin korunmasını aynı zamanda vücut ısısının düzenlenmesi ve organların mekanik olarak korunmasından sorumludur. Adipoz doku heterojen bir yapıya sahiptir. Adipositler, preadipositler, adiposit türevli kök hücreler, endotelyal hücreler ve bağışıklık hücreleri gibi birbirinden farklı çok sayıda hücre tipini barındırır. Adipoz doku adipokin adı verilen hormonları salgılaması nedeniyle bir endokrin organ olarak da tanımlanabilir.

Adipoz doku adipokinler ile sistemik sağlığı ve enerji metabolizmasının modülasyonunu gerçekleştirir. Adipokinlerin tamamı henüz aydınlatılamamış olsa da adipoz dokunun 600'dan fazla proteinin sekresyonunda rol aldığı kanıtlanmıştır. Adipokinler, iştah ve tokluğun ayarlanması, kan basıncının düzenlenmesi, lipid

dağılımının yönetilmesi, insülin salgılanması ve duyarlılığı, enerji metabolizması ve inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynar (Fasshauer ve Blüher, 2015; Trayhurn ve Wood, 2004). Adipokinlerin aynı zamanda adipogenez, bağışıklık hücrelerinin adipoz dokuya göçü ve adiposit fonksiyonunu düzenlediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Blüher, 2014). Adipoz doku salgıladığı inflamatuvar sitokinler ile aynı zamanda bir bağışıklık hücresi gibi de çalışır. Örnek olarak C-reaktif protein ve IL-6 gibi proinflamatuvar belirteçlerin obez kişilerde seviyelerinin arttığı tespit edilmiş ve tip 2 diyabetin gelişiminde risk faktörleri olarak değerlendirilmiştir. Ek olarak, leptin, resistin ve TNF- α gibi diğer adipokinler de proinflamatuvar yanıtta katkıda bulunur (Cabr , 2007). Adipoz dokunun genişlemesi, mevcut veya adiposit öncüllerinden yeni adipositler (hiperplazi) veya büyüyen adipositler (hipertrofi) ile mümkün olur. Adipoz dokunun dağılımı visseral yani organ çevresi ve subk ten yani deri altı yağ dokusu olarak ayrılmaktadır. Adipoz dokunun deri altı yağ dokusu ile visseral yağ dokusu arasında endokrin fonksiyonlar ve lipolitik aktivite bakımından farklılık göstermektedir. Yapılan  alışmalar ile inflamatuvar hücrelerin visseral yağ dokusunda deri altı yağ dokusuna kıyasla daha fazla bulunduğu gösterilmiştir (Bruun vd., 2005). Adipositler, adipoz doku heterojen bir yapıya sahip olmasına rağmen yağ dokuda en fazla buluna hücrelerdir ve bu dokunun ana bileşenidir aynı zamanda enerjinin trigliserit damlacıkları olarak depo edildiği temel yapılardır. Hiperplazi ile oluşan yeni ve daha küçük adipositler besin alımı sonrasında serbest yağ asitlerini ve trigliseritleri hızlıca depolarken adipositler büyüdükçe işlevlerini kaybetmeye bu nedenle insüline dirençli, lipolitik etki göstermeye başlarlar. Visseral yağ dokusunda deri altı yağ dokusuna oranla büyük adiposit sayısı daha fazladır. Deri altı yağ dokusunda ise küçük adiposit sayısı daha fazladır. Küçük adipositler, insüline daha duyarlıdır, serbest yağ asitleri ile trigliseritleri daha fazla depolayarak, bunların adipoz doku dışındaki dokularda birikmesini engeller (Ibrahim, 2010). Memelilerde 2 ana adipoz doku türü bulunur bunlar beyaz adipoz doku ve kahverengi adipoz dokudur. Bu 2 ana dokuya ek olarak onların ara formu olma özelliği gösteren bej adipoz dokunun varlığından da bahsedebiliriz. Yağ dokusunun enerji metabolizması vb. süreçlerde işlevini göstermesi bu dokuların eşsiz olarak gerçekleştirdiği süreçler ile mevcuttur. Beyaz adipoz doku total adipoz dokunun en büyük kısmını oluşturur ve temelde enerji depolanmasında sorumludur. Kahverengi adipoz doku yetişkinlerde toplam adipoz dokunun yaklaşık %4,3' n  oluşturur ve titremesiz termogenezden sorumludur (Lee, 2013).

1.4.1. Kahverengi adipoz doku

Kahverengi yağ dokusu, vücutta titremesiz termogenezden sorumludur ve ilk olarak hibernasyon yapan hayvanlarda ve yenidoğanlarda keşfedilmiştir. Bu doku, vücudun sıcaklığının korunması ve ayarlanmasından sorumludur (Rasmussen vd., 2013; Carter ve Schucany, 2008). İlk zamanlarda hem kahverengi hem de beyaz adipoz dokunun her ikisinin de aynı kökenden geldiği düşünülse de sonrasında yapılan çalışmalar ile bunun doğru olmadığı anlaşılmıştır. Kahverengi adipoz doku Myf5 ve Pax7 eksprese eden mezenkimal kökenli iskelet kası hücrelerine veya bazı beyaz adipositlere farklılaşabilen öncül hücrelerden meydana gelir (Sanchez-Gurmaches vd., 2012). Beyaz adipoz dokuda ise bu durum farklıdır. Kahverengi adipoz doku ve beyaz adipoz doku köken olarak birbirinden farklılık göstermelerinin yanı sıra morfolojik olarak da birbirinden ayrılır. Kahverengi adipoz doku çok sayıda küçük (multiloküler) lipid damlacıklarına, merkezde konumlanmış bir çekirdeğe ve bol miktarda mitokondriye sahiptir. Depolanan bu lipitler bu iki doku arasında kullanım amacıyla birbirinden ayrılır. Beyaz adipoz dokunun tersine kahverengi adipoz doku da depo edilen lipitler oksidatif fosforilasyon ve ısı üretimi için yakıt olarak kullanılır. Bu durum büyük ölçüde kahverengi adipoz doku mitokondrilerinin kendine özgü UCP-1 adı verilen bir proteinin işlev göstermesinden kaynaklanır (Klaus vd., 1991; Cannon vd., 1982). UCP-1 adı verilen bu protein kahverengi adipoz dokuya özgüdür ve bu nedenle yapılan çalışmalarda kullanmak adına iyi bir belirteçtir. UCP1, kahverengi adipositlerde fazla miktarda eksprese edilir ve kahverengi adipoz dokunun ısı üretme kapasitesini düzenler. Yapılan bir çalışmada farelerde UCP-1 ekspresyonu engellenmiş ve sonrasında bu fareler uzun süreli soğuğa maruz bırakılmış. Bu maruziyet sonrası UCP-1 varlığından yoksun olan fareler hayatta kalamamış ve böylelikle UCP-1'in termogenez için önemi gösterilmiştir (Golozoubova vd., 2001). UCP1, mitokondrinin iç membranında lokalizedir. UCP-1 burada protonların mitokondri iç zarı boyunca intermembran boşluktan matrikse geri akışını sağlayarak proton gradyanını azaltır. Bu süreç, ATP üretimi olmaksızın ısı üretimini sağlar. Kahverengi yağ mitokondrileri haricinde insan hücrelerin de bulunan neredeyse tüm mitokondriler lipidler veya glukoz kullanımıyla ATP sentezi gerçekleştirir. Bu süreç, oksijen tüketimi esnasında meydana gelen enerjinin ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunda kullanıldığı solunum eşleşmesidir. Kahverengi adipoz doku mitokondrileri ise UCP-1 barındırmaları nedeniyle ADP'nin fosforilasyonu olmaksızın oksijen tüketimi gerçekleşebilir ve

enerji tamamıyla ısı olarak dağılır (Chouchani vd., 2019). UCP-1 yardımıyla gerçekleştirilen bu süreçte sayesinde kahverengi adipositler yağ yakma potansiyeli kazanmaktadır. Bu nedenle obezite ve buna bağlı olarak gelişebilecek metabolik hastalıkları önlemek adına kahverengi adipoz doku önem arz etmektedir (Fenzl ve Kiefer, 2014). Bu sistemin aktivasyonu birçok yolla gerçekleşebilir. Bu yollardan biri ve en önemlisi vücudun rahat olduğu sıcaklığın altındaki sıcaklıklar ile sistemin tetiklenmesi sebebiyle sempatik sinir sisteminin uyarılması ve norepinefrin sekresyonunun gerçekleşmesidir. Salgılanan norepinefrin ise β -adrenerjik reseptörler vasıtasıyla etkisini gösterir ve termogenezin aktivasyonuna sebep olur (Bachman vd., 2002). Bu yollardan bir diğeri ise besin alımı yoluyla sistemin tetiklenmesidir. Kapsaisin gibi gıdaların bu sistemin aktivasyonuna sebep oldukları yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu süreç, "diyet kaynaklı termogenez olarak bilinmektedir (Kawada, 1986).

1.4.2. Beyaz adipoz doku

Enerji depolanması, insülin duyarlılığı ve endokrin iletişim bakımından büyük bir öneme sahip olan beyaz yağ doku, memelilerde yağ dokunun en büyük kısmını oluşturur. Beyaz yağ doku, tek bir sitoplazmik lipid damlacığına (uniloküler), az sayıda mitokondriye ve periferde bulunan bir çekirdeğe sahip olgun beyaz adipositlerden meydana gelir. Beyaz yağ doku, alınan fazla enerjiyi lipid damlacıklarında trigliserit formunda depolayabilir ve fazla enerji istenen durumlar olduğu koşullarda serbest yağ asitlerine çevrilerek dolaşıma salınabilir. Aynı zamanda beyaz adipoz doku organları ve vücudu mekanik hasarlara karşı koruyabilir. Enflamasyon ve metabolizma ile ilgili adipokinleri salgılayabilir tüm bunların yanı sıra insülin aracılı glukoz alımında sinyal iletim yolağının devreye sokulmasında anahtar organ gibi davranabilir.

Ek olarak bulunduğu lokasyona göre inflamatuvar yanıtı ve insülin direncini destekleyebilir (Sarjeant ve Stephens, 2012). Beyaz Adipoz Doku vücutta en fazla bulunan yağ doku türüdür ve vücudun neredeyse her bölgesinde rastlanır. Başlıca beyaz adipoz doku vücutta bulundukları yere göre subkutan veya visseral olarak ayrılabilir. Beyaz adipoz doku çoğunlukla karın, kalça, uyluk ve omentum gibi bölgelerde fazlaca bulunmaktadır (Karastergiou ve Fried, 2017).

Beyaz adipositler, CD24, CD34 ve PDGFR α pozitif olan mural öncüllerden köken almaktadır (Berry ve Rodeheffer, 2013). Beyaz yağ hücreleri kahverengi adipoz dokuya kıyasla daha fazla lipid depolama yeteneğine sahiptir, çapları yaklaşık 100 μm 'ye ulaşabilir (Cinti, 2012). Bu adipoz dokunun belirteç genleri olarak leptin, lpl (lipoprotein lipaz), FABP4 (fatty acid binding protein 4), Rb1 (RB transcriptional corepressor 1) verilebilir (Ziqubu, 2023).

1.4.3. Bej adipoz doku

Bej adipoz doku ara morfolojiye sahip pauciloküler/multiloküler yapıya sahip, yüksek sayıda mitokondri içeren, UCP-1 ve leptin ekspresyonu gerçekleştiren ve çevresel durumlara bağlı olarak termogenik veya yağ depolama özelliği gösteren adipositleri içeren adipoz dokudur (Zoico vd., 2019). Bej Adipositler, kahverengi ve beyaz yağ hücrelerinin ara formu olma özelliği gösteren hem kahverengi hem de beyaz adipositlerin özelliklerini paylaşan bir tür adipositir. Çoğunlukla deri altı beyaz yağ dokusunda yer alan öncül adiposit alt türünden meydana gelir ya da halihazırda bulunan beyaz adipositlerin başka bir hücre tipine dönüşümü sonrasında meydana gelir. Bej adipositler çoğunlukla kahverengi yağ hücreleri benzeri yapı gösterse de uygun uyaranlar altında ısı üretici bir özellik gösterebileceği gibi yağ depolayıcı bir forma da dönüşebilir (Wu vd., 2012; Barbatelli vd., 2010).

Bej adipositler beyaz yağ dokusunda bulunur ve kahverengi yağ dokusunda bulunan kahverengi adipositlerden genetik olarak farklıdır, bunun nedeni kahverengi adipositlerin myojenik faktör 5 öncüllerinden türevlenmesidir (Seale vd., 2008). Yapılan çalışmalarla CD137, Tmem26 ve Tbx1 belirteçlerinin ekspresyon seviyelerini tespit etmek bej adipositlerin varlığını tespit etmek adına faydalı olabileceği bulunmuştur (Wu vd., 2012).

1.5. Adiposit Kahverengileşmesi

Obezite, enerji alımının ile enerji harcanması arasında meydana gelen dengesizliğe dolayısıyla alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olmasına bağlı olarak meydana gelir. Obeziteyi önlemek veya tedavi etmek adına yapılan müdahaleler çoğunlukla uzun vadeli olmaz ve yeni yollar arayışına girilir. Kahverengi adipoz dokunun keşfiyle

beraber kahverengi adipositlerin yağ yakma potansiyelleri tanımlanmış ve bunun obeziteyle mücadele de kullanımı adına çalışmalar yoğunlaşmıştır. Kahverengi adipositlerin enerji kaynağı adına lipitleri kullanması nedeniyle de bu çalışmalarda özellikle beyaz adipositlerin kahverengileştirilmesi kavramı öne çıkmıştır. Endojenik, farmakolojik ve besinler kullanılarak bu dönüşümün tetiklenmesi kahverengileşme çalışmalarının ana ögesi haline gelmiştir (Montanari vd., 2017).

Kahverengi yağ dokusu, termogenez yeteneği sebebiyle obezite çalışmalarında önemlidir bu süreci UCP-1 proteini ATP üretimi olmaksızın ısı üretimiyle gerçekleştirir. UCP-1 sadece kahverengi adipoz dokuda eksprese edilir bu nedenle obez bireylerde ekspresyonunun artması enerji harcanışını dengeleyebileceği için ekspresyonunda meydana gelen artış önem arz etmektedir. Kahverengileşme beyaz adipoz dokuda yer alan preadipositlerin kahverengi benzeri bir forma dönüşmesidir. Kahverengileşme sonrasında beyaz adipoz dokuda yer alan bej ya da brite adı verilen adipositlerin oluşumu görülür. Bu adipositler kahverengi adipositler ile aynı kökenden gelmemesine rağmen lipit depolarının çok loküllü olması, mitokondri yoğunluklarının fazla olması, mitokondrilerinden UCP-1 ekspresyonu gerçekleştirmeleri ve termogenez ile ilgili anahtar genlerin ekspresyonunu gerçekleştirmeleri gibi birtakım özellikleri paylaşırlar. Kahverengileşme ile bej ya da brite adipositler elde edilebileceği gibi başka gelişimsel yollar ile de bu adipositlerin gelişimi mümkün olmaktadır. Örneğin Myh11+ düz kas öncülleri veya mezodermal kök hücrelerden köken alan preadipositlerin diferansiyasyonu yoluyla da bej ya da brite adipositlerin oluşumu da söz konusu olmaktadır (van Marken Lichtenbelt vd., 2009; Virtanen vd., 2009; Nedergaard ve Cannon, 2013).

Bej adipositlerin oluşumu ile ilgili temelde 2 süreç bulunmaktadır bunlar de novo farklılaşma ve transdiferansiyasyon'dur. De novo farklılaşma, progenitör hücrelerin soğuğa maruz kalma, egzersiz, adrenejenik süreçler, tiroid hormonları ve besin alımı gibi birtakım adipojenik uyaranlarla bej adipositlere farklılaşması sürecini ifade eder. De novo teoriyle bej adiposit oluşumu sürecinde rol oynayan düz kas benzeri hücrelerde Myh11+, preadipositlerde Pdgfrb+ ve SMA+, adiposit öncüllerde Sca-1+, Pdgfra+ ve CD81+ gibi çok sayıda marker tanımlanmıştır. Belirli uyaranlar ile kahverengileşme süreci için elzem olan Ucp1, Prdm16 ve Pgc1a gibi kahverengileşme ile ilgili genlerin ekspresyonunda artış meydana gelir. Böylelikle bej ya da brite

denilen adipositlerin oluşum süreci tetiklenir. Kahverengileşme ile ilgili önemli olan ve bej adiposit oluşum sreclerinden bir diğeri olan trans diferansiyasyon süreci ise bej adipositlerin olgun beyaz adipoz dokudan meydana geldiğini ileri süren teoridir. Bu sürecin nasıl gerçekleştiğı hala tam olarak bilinmemekle beraber yapılan çalışmalarla deri altı beyaz yağ dokusunu bu süreçte aktif olduğu bildirilmiştir. Kahverengileşme olarak bilinen bu süreç özellikle UCP-1 gibi belirteçlerin ekspresyonunun artırılmasını hedefler (Rosenwald vd., 2013; Petrovic vd., 2010; Gupta vd., 2012). Kahverengileşme sürecinin tetikleyen çok sayıda uyaran olduğu yapılan çalışmalar ile tanımlanmıştır. Bunlardan biri soğuğa maruziyettir. Soğuğa maruziyetle beraber β 3-adrenerjik reseptör sisteminin çalışması ve böylelikle beyaz adipoz dokunun kahverengileşmesi mümkün olmaktadır (Peng vd., 2015). Bir diğeri ise egzersizdir. Egzersiz beta-aminoisobtirik asit, irisin ve fibroblast büyüme faktörü 21 (FGF21) gibi moleküllerin ekspresyonunu artırarak kahverengileşmeyi destekler. Hormonlar kahverengileşme sürecinde önemli işlevleri yerine getirir rneğın FGF21 stres yanıtı bir hormondur, melatonin uykıyla ilişkilendirilen aynı zamanda kahverengileşme sürecinde görev alan bir hormondur. Bu durum bireyin yaşam tarzının kahverengileşme sürecinde önemini vurgulamaktadır (Hondares vd., 2011). Kahverengileşme sürecini tetikleyen başka süreçler ise kapsaisin gibi bazı besin maddelerinin alımı, aralıklı oruç uygulaması ya da kalori kısıtlaması yapılmasıdır (Baskaran vd., 2016). Tüm bunlara ek olarak bağırsak mikrobiyotası da termogenezi tetikleyen safra asit seviyelerinin düzenlemeleri sebebiyle önemli bir faktördür. Tüm bu uyaranlar ve daha fazlası kahverengileşmenin gerçekleşmesi ve metabolik süreçlerin düzenlenmesi adına işlev gösterir (Machado vd., 2022).

1.6. Markörler

1.6.1. 18S

İnsan gibi karmaşık biyolojik süreçlere sahip olan canlılarda meydana gelen değişimlerin, mRNA ekspresyonu gibi nispeten erken olarak nitelendirilebilecek bir aşamada aydınlatılması hedef gen ekspresyonunun araştırılmasıyla başlar. Bu sebeple en sık kullanılan yöntem ise daha uygulanabilir olması nedeniyle gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonudur (Khslar vd., 2020). Gen ekspresyon

profilleri qRT-PCR dışında Northern blot, cDNA mikroarray, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) gibi teknikler ile de incelenebilmektedir (Kozera ve Rapacz, 2013). Ancak qRT-PCR, araştırılmak istenen dokulardaki mRNA'ları yani haberci ribonükleik asitlerin kantitatif olarak belirlenmesinde en sık kullanılan en hassas ve doğru sonuç veren metottur. Deney sonrası elde edilen verilerin stabil olarak eksprese olan bir referans gen ile yani hedef gen ile ortak düzenlenmeyen veya deney koşullarından etkilenmeyen bir gen ile normalize edilmesi gerekir. Normalizasyonun sağlanmasında kullanılan bu gen housekeeping gen olarak bilinir ve dışarıdan bir uyarı olmaksızın sürekli olarak yüksek miktarlarda eksprese edilir (da Conceição Braga vd., 2021). Bir gen güvenilir bir referans olarak kabul edilirken organizmanın farklı fizyolojik koşullarda veya farklı dokularda ekspresyonel değişiminin minimum seviyede olması vb. birkaç önemli faktörü taşıması gerekmektedir. En önemlisi ise referans genin ekspresyon seviyelerinin deney koşullarından etkilenmemesidir (Chervoneva vd., 2010). Bu koşulları en iyi şekilde sağlayan genlerin, hücresel hayatta kalma için gerekli olan ve temel metabolizma süreçlerinde işlev gören genler olduğu bildirilmiştir (Thellin vd., 1999). Yıllar boyunca en iyi referans genin belirlenmesine yönelik olarak birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, referans genlerin ekspresyon seviyelerinin dokuya ve hücre tipine bağlı olarak farklılık gösterebileceğini anlaşılmıştır. Bu nedenle referans gen seçimi yapılan deneye bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Mansur vd., 1993; Blomberg vd., 1987). Çalışmalarda sıklıkla kullanılan 18S referans geni, genomda birden fazla kopyaya sahiptir ve bu durum diğer tek kopyalı genlere oranla PCR için daha hassas bir şablon sağlamaktadır. Ek olarak, yüksek seviyede korunmuş bölgelere sahiptir. Bu durum hedef genin normalizasyonu için avantaj sağlamaktadır (Hofstetter vd., 2024).

1.6.2. UCP-1

UCP1, kahverengi yağ dokusuna özgü 32 kDa'lık bir proteindir. Kahverengi yağ doku vücut ısısının ayarlanması, soğuğa adaptasyon vb. koşulları sağlayabilmek adına fazla miktarda mitokondri bulundurur ve bu mitokondrilerinde UCP-1 adı verilen bir protein işlev görür (Porter, 2006). UCP-1 yani ayrıştırıcı protein-1 ilk olarak 1976 yılında PAGE ile tanımlanmıştır. UCP1, mitokondrinin iç membranında yer alır ve mitokondriyal substrat oksidasyonunu ATP üretiminden ayırarak enerjiyi dağıtır.

Böylelikle, UCP1, protonlara farklı bir yol kazandırarak ATP yerine ısı üretimini sağlar (Cannon ve Nedergaard, 2004). Gerçekleşen bu ısı üretimi ile kahverengi adipoz doku, yenidoğanlarda ve hibernasyon yapan memelilerde titreme olmaksızın ısı üretimini sağlar. Kahverengi adipoz doku mitokondrilerinin ayrılmış (uncoupled) olduğu daha öncesinde yapılan çalışmalar ile bulunmuştur. Bu mitokondrilerin yeniden eşleştirilmesi (coupling) BSA ve pürin nükleotidlerinin eşzamanlı olarak ilave edilmesiyle mümkün olmaktadır. Nükleotid bağlayıcı protein konsepti bu duruma yanıt olarak ortaya çıkmıştır ve bu konsept ayrışmanın yağ asitleri tarafından aktive edilmesini kapsamaktadır (Klingenberg, 1990). UCP-1 ekspresyonunun ölçülmesi yapılan bir uygulama sonrası beyaz adipoz dokunun kahverengi benzeri bir yapı kazanıp kazanmadığını tespit etmek açısından önemlidir. Beyaz yağ hücrelerinin kahverengi benzeri bir fenotip kazanması, mitokondri yoğunluğunun ve UCP1 ekspresyonunun artmasıyla yakından ilişkilidir. Kahverengileşme denilen bu süreç, enerji harcanmasını teşvik eder bu nedenle obezite ve metabolik hastalıklarla mücadelede son zamanlarda odak noktası haline gelmiştir (Bargut vd.,2017).

1.6.3. GLUT-4

Kan glukoz seviyeleri, temel olarak hepatik glukoz üretimi ile hücrel glukoz alımı arasında bulunan hassas bir düzen ile dengede tutulur. Hücrel glukoz alımı insülin hormonu ile düzenlenir. İnsülin beslenme sonrası kanda bulunan glukoz miktarını düzenlemek adına glukozun hücre içine alınımını sağlayan sinyal iletimini başlatır. Salgılanan insülin, cevap veren yağ veya kas gibi hücrelerde glukoz alımını artırır (Das, 1999). Bu durum glukozun hücre zarından geçerek hücre içine transportunu sağlayan GLUT (glukoz taşıyıcı proteinler) adı verilen bir grup taşıyıcı ile mümkün olur. Bu taşıyıcılar birden fazladır ve hücrede çeşitli görevlere sahiptir. Bu taşıyıcılar arasında GLUT-4 temel olarak insüline duyarlı dokularda eksprese olur bu nedenle bir çalışmada insülin duyarlılığını veya insülin direncini tespit etmek amacıyla GLUT-4 ekspresyonunu incelemek mantıklıdır (Jentjens ve Jeukendrup, 2003). İnsülinin yanıt veren hücrelere bağlanmasıyla beraber normal koşullarda sitoplazmada bulunan GLUT-4'ün plazma membranına hareketi gerçekleşir. Plazma membranına yerleşen GLUT-4 hücre dışında bulunan glukozun hücre içine girmesine aracılık eder böylelikle kanda bulunan fazla miktardaki glukoz azaltılarak homeostaz sağlanır (Morato vd., 2013). İnsülin, GLUT-4'ün plazma membranına translokasyonunu

fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) aracılı bir yolak vasıtasıyla gerçekleştirir (Russell vd.,1999). Yapılan birçok çalışma ile tip 2 diyabet başta olmak üzere diyabet durumunda insülinin aracılık ettiği glukoz transportunda bir azalma olduğu gösterilmiştir. Yine yapılan çalışmalar ile GLUT-4 ekspresyonunun diyabet rahatsızlığına sahip olan hastalarda olmayanlara kıyasla azaldığı tespit edilmiştir (Le Marchand-Brustel vd., 1999).

1.6.4. PGC-1 α

Transkripsiyonel koaktivatörler, transkripsiyonel korepresörler ve transkripsiyon faktörlerini içeren bir sistem ile mitokondriyal genlerin ekspresyonu koordine edilir. Bu ağ içerisinde en fazla çalışılmış olan ise peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör gama ortak aktivatörü-1 alfa (PGC-1 α)'dır. PGC-1 α ilk keşfedildiğinde soğuğa bağlı olarak gelişen enerji metabolizmasının düzenleyicisi olduğu bildirilmiştir sonrasında yapılan çalışmalar ile ise neredeyse tüm dokularda yaygın olarak eksprese edilen PGC-1 α 'nın mitokondriyal fonksiyonunun başlıca düzenleyicilerinden biri olduğu ortaya çıkarılmıştır (Miller vd., 2019). PGC-1 α bir transkripsiyon koaktivatörüdür. Bir transkripsiyon koaktivatörü, transkripsiyon faktörleriyle ilişki kuran ve kurduğu bu ilişkiyle bir genin transkribe edilme ihtimalini yükselten fakat kendisi DNA'ya doğrudan bağlanmayan bir protein veya protein kompleksidir. PGC-1 α , oldukça fazla sayıda transkripsiyon faktörüyle etkileşime girer bu nedenle adaptif termogenez, yağ asidi metabolizmasının düzenlenmesi, mitokondri biyogenezi gibi birçok biyolojik süreçte rol alır (Puigserver ve Spiegelman, 2003). Bir transkripsiyonel ortak aktivatör olarak, peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör PPAR γ ortak aktivatörü- α , kalp, iskelet kası, karaciğer, böbrek, kahverengi yağ dokusu ve beyinde yüksek oranda eksprese edilir (Liang ve Ward, 2006). PGC-1 α ekspresyonu mitokondriyal yoğunluğun fazla olduğu ve oksidatif metabolizmanın daha aktif olduğu bu dokularda daha yüksekken tam tersi yönde karaciğerde düşük ve beyaz yağ dokusunda ise çok daha düşüktür (Puigserver vd., 1998). PGC-1 α 'nın ekspresyonunun yüksek olduğu kahverengi yağ doku, adaptif termogenezle ısı üretiminde önemli bir yer kaplamaktadır. Son zamanlarda obezitenin artışı ile bu konuya karşı, obeziteyle mücadelede savunma mekanizması olarak kullanılabilir olması nedeniyle, ilgi artmıştır. Bu da yağ dokunun farklılaşmasının düzenlenmesine dair yapılan çalışmaların artmasını da beraberinde getirmiştir (Rothwell ve Stock, 1979).

Kahverengi yağ dokuya farklılaşmanın nasıl gerçekleştiğine dair yapılan çalışmalar ile PGC-1 α 'nın PPAR- γ 'ya bağlandığı ve böylelikle aktivasyonu gerçekleştirerek kahverengileşme mekanizmasında rol alan genlerin aktivasyonunu sağladığı ortaya çıkarılmıştır (Wu, 1999).

1.6.5. PPAR- γ

Peroksizom proliferatör-aktive edilen reseptörler (PPAR'lar), hücre farklılaşması dahil olmak üzere daha birçok metabolik olayda işlev gösteren transkripsiyon faktörleridir. Özellikle lipid ve glikoz homeostazında görevli önemli genleri düzenlerler. PPAR ailesi, üç alt türden oluşur bunlar; PPAR α , PPAR β/δ ve PPAR γ 'dır. Bu üç alt türün dokulardaki dağılımları ve yerine getirdiği fizyolojik roller aralarında farklılık gösterir (Berger ve Moller, 2002). PPAR γ , ekspresyonu beyaz ve kahverengi dahil olmak üzere tüm yağ dokuda, aynı zamanda kalınbağırsak ve dalak gibi organlarda gerçekleşir. Fakat ekspresyon seviyesinin en yüksek olduğu doku adipoz dokudur burada adipositlerin farklılaşmasında, enerji ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde birincil olarak rol oynar (Medina-Gomez vd., 2007). Adipositlerde işlev gösteren PPAR γ , insülinin düzenlenmesinde ihtiyaç duyulan adiponektin ve leptin gibi adipokinlerin salgılanmasını sağlar. Bu nedenle diğer birçok işlevinin yanında insülin duyarlılığını artırmaya yönelik olarak da etki gösterir. PPAR γ aynı zamanda lipid metabolizmasının düzenlenmesinde gerekli olan LPL (lipoproteinlipaz) gibi genleri düzenleyerek; yağ asitlerinin salınımını, taşınmasını ve depolanmasını da düzenler (Janani, ve Ranjitha Kumari, 2015).

1.6.6. mtHSP70

Isı şoku proteinleri (HSP'ler) temel olarak yanlış katlanmış proteinlerin parçalanması, proteinlerin katlanması, inflamatuvar yanıtın düzenlenmesi ve şaperon ile yönlendirilen otofaji gibi olaylarda işlev görürler. HSP'ler hücre dışında veya hücre içinde ifade edilmelerine göre farklı görevleri yerine getirirler. Hücre dışında ifade edilen HSP'lerin inflamasyon ve bağışıklıkta görev aldığı düşünülmekte fakat işlevleri hala tam olarak aydınlatılabilmemiş değil (Yıldırım ve Tatar 2022).

mtHSP70 ısı şoku proteinleri ailesinin bir üyesidir ve ekspresyonlarının fiziksel veya kimyasal bir strese maruziyet ile stimüle edilir. Aynı zamanda HSP70 proteinlerin üç boyutlu yapısını kazanırken katlanmalarını düzenlemektedir. Daha öncesinde yapılan çalışmalar ile hücre dışında HSP70 seviyelerinin tip 2 diyabet ve diğer inflamatuvar hastalıklar ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Alemi vd., 2019). Yine yapılan çalışmalar ile hücre içinde ifade edilen HSP70'lerin inflamatuvar yanıtla ilişkili olan c-Jun N-terminal kinazların (JNK'lerin) çalışmasının engellenmesi yani blokajı yoluyla hem inflamatuvar yanıtın hem de buna bağlı olarak gelişen insülin direncinin önlenmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Park vd., 2001; Chung vd., 2008). HSP70'in obeziteye bağlı inflamatuvar yanıtla gelişen insülin direncine karşı koruyucu yapısı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Chung vd., 2008).

HSP70'in herhangi bir stres durumunda ekspresyonlarının indüklendiği bilinen bir durumdur, ısı stresi de bu indükleyici stres koşulları arasında yer almaktadır. Yapılan bir çalışma ile bu ısı stresi durumunun adiposit kahverengileşmesi üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışma ile sıçanlar soğuğa maruz bırakılmış ve bu maruziyet sonrası sıçanların vücudunda anlamlı bir vücut sıcaklığı değişimi olmamasına rağmen kahverengi yağ dokuda HSP70 ekspresyonunun 5 kat arttığı görülüyor. Bu durum HSP70 ekspresyonunun ısıya bağlı stres durumunda farklı mekanizmalar ile tetiklendiğini soğuğa maruziyet sonrası UCP-1 aktivasyonunun gerçekleştiği ve buna bağlı olarak meydana gelen ısı artışının HSP70 ekspresyonunu indüklediği bildiriliyor (Matz vd., 1996). Bu çalışmalar HSP70'in inflamatuvar duruma bağlı gelişen insülin direncinde etki göstermesinin yanı sıra adiposit kahverengileşmesinde de bir rolü olabileceğini gösterir niteliktedir.

1.6.7. mtHSP60

HSP60 mitokondriyal fonksiyonun desteklenmesinde görevli olan bunu da HSP10 ile etkileşime girerek ve böylelikle mitokondriyal proteinlerin düzgün katlanmasını sağlayarak yapan bir ısı şoku proteindir (Bie vd., 2020). Obezite ve diyabet durumunda HSP60 ise adipositlere bağlanabilme böylelikle proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salgılanmasına sebep olarak diyabetin gelişimiyle sıkıca bağlantılı olan inflamatuvar süreçleri indükleyebilme yeteneğine sahiptir. Bu durum yapılan çalışmalar ile iyice çalışılmıştır. Obez olmayan diyabete sahip farelerde yapılan bir çalışmada

pre-diyabet aşamada anormal HSP60 seviyeleri gözlemlenmiştir (Brudzynski,1993). Aynı zamanda başka yapılan çalışmalar ile de bu durum desteklenmiş tip 2 diyabetli hastaların dolaşımlarında HS60 seviyelerinin arttığı görülmüş. Bu durum HSp60 seviyelerinin obezite ile gelişen inflamatuvar yanıt ve insülin direncinin gelişimi ile pozitif bir ilişki göstermektedir (Dasu vd., 2010).

1.6.8. C/EBP- α

Diferansiyasyon, proliferasyon gibi bazı özel hücrel aktivitelere yerine getirilmesi gen ekspresyonunda meydana gelen değişimleri de beraberinde getirir. Bu süreçlerin kontrolü transkripsiyonel düzeyde gerçekleşir ve bu kontrol hedef genin promotör ve enhancer bölgelerinde yer alan düzenleyici diziler ile transkripsiyon faktörlerinin etkileşime girmesi ile mümkün olur. CCAAT/enhancer bağlama proteini (C/EBP) ailesine ait transkripsiyon faktörleri de bu doğrultuda işlev gören diğer üyeler gibi proliferasyon ve farklılaşma, metabolizma, inflamasyon gibi birçok sürecin kontrolünde yer almaktadır. C/EBP ağırlıklı olarak adipositlerde, hepatositlerde ve hematopoetik hücrelerde bu işlevini yerine getirmektedir (Ramji ve Foka 2002). Adipojenik farklılaşma hücreleri farklılaşmaya yönlendirecek belirli genlerin ekspresyonunu içeren ve nihai olarak lipid birikimine iten bir süreçtir. Adiposit farklılaşmasını yönlendiren temelde üç grup transkripsiyon faktörü bildirilmiştir. Bunlar PPAR γ , (C/EBP'ler) ve ADD-1/SREBP-1'dir (Yang vd., 2011). Yapılan çalışmalar ile de C/EBP- α 'nın adipojenik farklılaşma için gerekli olduğu ve lipid birikimini sağladığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada C/EBP- α nakavt farelerde lipid birikiminin anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir (Roesler, 2001).

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Safranal bileşiminin temin edilmesi

Tez çalışması kapsamında kullanılan Safranal, safran bitkisinin karakteristik aromasının oluşmasına katkı sağlayan aynı zamanda safran bitkisinin esansiyel yağında çok fazla miktarda bulunan ve *Crocus sativus*'tan elde edilen aromatik bir bileşiktir. Bu kapsamda çalışmalarda kullanmak adına BIOSYNTH firmasının FD751811901(Carbosynth Limited) lot numarasına sahip ürünü tedarik edilmiş ve ürün daha sonrasında çalışmalarda kullanılmak adına 10 °C ila 25 °C arasında muhafaza edilmiştir.

2.1.2. 3T3-L1 Hücre hattı

Yürütülen çalışmada 3T3L-1 hücre hattı kullanılmış olup bu hücre hattı ATCC firmasından temin edilen ve pasajlanarak sıvı azot içerisinde saklanmış olan hücrelerdir. 3T3L-1 hücre hattı, taksonomik adı *mus musculus* olan, fare embriyonik dokularından elde edilen aynı zamanda fibroblastik bir yapıya sahip olan uygun uyaranlar altında olgun adipositlere farklılaşabilen preadiposit hücrelerdir. 3T3L-1 hücre hattı, farklılaştırma sonrası fibroblastik morfolojisini değiştirerek lipid akümüasyonu yapabilmeleri sebebiyle, obezite, adipogenez ve diyabet çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

2.1.3. Kimyasal materyaller

Tez çalışması sırasında hücre kültürü, RNA izolasyonu, oil red o boyama, cDNA sentezi ve qPCR deneylerinde birçok kimyasal madde kullanılmıştır. Kullanılan tüm kimyasallar ve satın alındıkları firmalar ile katalog numaraları aşağıdaki çizelgede belirtilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Kimyasallar

Kimyasal Madde	Firma Adı / Katalog No
DMEM	Capricorn Scientific / DMEM-HPA
Deksametazon	Sigma / BCBV5460
IBMX	Sigma / STBF6061V
İnsülin	Sigma / SLBV1793
NCS	Capricorn Scientific / NCS-1B
FBS	Capricorn Scientific / FBS-11B
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific / PS-B
Trypsin	Capricorn Scientific / TRY-1B
Dulbecco's PBS	Capricorn Scientific / PBS-1A
MTT	BIOTIUM / 10059
cDNA Sentez Kit	abm / G236
Oil Red O	Bio Basic / OD0395
Hematoksilen	ChemBio / CB6605
İzopropanol	Tekkim / TK.090250
Kloroform	Merck / 1024452500
Etanol	Merck / 1009832500
Riboex™ RNA İzolasyon Kit	GeneAll / 301-902
Real Q Plus 2X Master Mix	Ampliqon / A323402
Agaroz	Sigma / 102346215
Bromophenol Blue	BioShop / BRO777

2.1.4. Primerler

qPCR deneylerini gerçekleştirmek adına 7 tane primer kullanılmıştır. Kullanılan bu primerlerden altısı daha önceden tasarlanan ve laboratuvarımızda uygun depolama koşullarında tutulan primerlerdir. UCP-1 primeri ise Kong vd. (2022) tarafından yayınlamış olan makale referans alınarak sipariş edilmiş ve çalışmalarda kullanılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan primerlerin sekans bilgileri ve hangi amaca hizmet ettiğine yönelik bilgiler aşağıda yer alan çizelgede belirtilmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Primerler

İnsülin Duyarlılığı ile ilgili markörler	Glut-4 (Glucose Transporter-4)	F: 5'-GAGCCTGAATGCTAATGGAG-3' R: 5'- GAGAGAGAGCGTCCAATGTC-3'
	mtHSP60 (Mitochondrial heat shock protein-60)	F: 5'-GCCACTTGACCTTTCACCC-3' R: 5'-ATCACAGTTCTTCCCTTTGGC-3'
	CEBP- α (CCAAT Enhancer Binding Protein alpha)	F: 5'-CGCAAGAGCCGAGATAAAGC-3' R: 5'-GCGGTCATTGTCACTGGTCA-3'
	PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma)	F: 5'-CTATGAGCACTTCACAAGAAATTA-3' R: 5'-CTGGAGAAATCAACTGTGGT-3'
Kahverengileşme ve Mitokondri ile ilgili markörler	UCP-1 (Uncoupling Protein1)	F: 5'-AAAGTCCGCCTTCAGATCCA-3' R: 5'-TGAGTCGTAGAGGCCAATCC-3'
	mtHSP70 (Mitochondrial heat shock protein-70)	F: 5'-CTATGAGCACTTCACAAGAAATTA-3' R: 5'-CTGGAGAAATCAACTGTGGT-3'
	PGC-1 α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma Coactivatör-1- alpha)	F: 5'-GCGCCGTGTGATTACGTT-3' R: 5'-AAAACCTTCAAAGCGGTCTCTCAA-3'
	Housekeeping gen	18 S F: 5'-TTCGAACGTCTGCCCTATCAA-3' R: 5'-ATGGTAGGCACGGCGACTA-3'

2.2. Metot

2.2.1. Safranal ara stok hazırlanması

Safranal bileşiği ticari olarak tedarik edilmiş ve ürün çalışmalarda kullanılacağı süreye kadar 10 °C ila 25 °C arasında muhafaza edilmiştir. Ticari olarak satın alınan bileşiğin 10^3 µM konsantrasyonda ve 20 ml hacimde olacak şekilde ara stoğunun hazırlanmasına karar verilmiştir. Bu kapsamda satın alınan bileşiğin moleküler ağırlığı 150,22 g/mol, yoğunluğu 0,975 g/ml ve hacmi 2 g olarak tespit edilmiştir. Ve bu bilgiler kullanılarak gerekli hesaplamalar yapılmış sonuç olarak ana stoktan 3,08 µL safranal alınmış ve 20 ml DMEM içerisinde homojenize edilerek sonraki çalışmalarda kullanmak amacıyla +4°C’de muhafaza edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları sırasında hazırlanan bu ara stok kullanılmış olup safranal içeren besiyerleri hazırlanmadan önce 37 °C su banyosunda ısıtılmış ve iyice homojenize edilmiştir.

2.2.2. Hücre kültürü çalışmaları

Bu tez çalışmasında kullanılan 3T3-L1 hücre hattı daha öncesinden satın alınan ve uygun büyüme ortamında çoğaltılarak pasajlanan, sonrasında freezing medium kullanılarak aşamalı olarak dondurulan böylelikle nihai olarak sıvı nitrojende stoklanan hücrelerdir. Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin, canlılıklarını devam ettirebilmeleri, büyümeleri, farklılaşmaları ve proliferasyonlarını sağlamaları adına birtakım özel maddeleri içeren büyüme (GM) ve farklılaşma (DM) ortamlarına ihtiyaçları vardır. Hücrelerin büyüüp çoğalmaları ve hayatta kalmalarına olanak sağlayan büyüme ortamı hazırlanırken DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium), NCS (Newborn Calf Serum) ve Penisilin-Streptomisin kullanılmaktadır. Hazırlanmış olan büyüme ortamının toplam hacminin %89’u DMEM, %10’u NCS ve %1’i Penisilin-Streptomisin olması gerekmektedir. Aynı şekilde hücrelerin preadiposit morfolojilerini kaybederek, çalışmada kullanılacak deney modelini oluşturmak adına, lipid birikimi ile olgun adiposit morfolojisi sergilemelerini stimüle ederken ise farklılaşma ortamına gerek duyulur. Farklılaşma ortamı hazırlanırken DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium), FBS (Fetal Bovine Serum) ve Penisilin-Streptomisin kullanılmaktadır. Hazırlanmış olan farklılaşma ortamının toplam hacminin %89’u DMEM, %10’u FBS ve %1’inin Penisilin-Streptomisin olması

gerekmektedir. Her iki ortamda kullanılan DMEM, hücrelerin ozmotik dengesini korumak ve zar potansiyelini regüle etmek adına sodyum pirüvatlı, aynı zamanda azot ve ikincil bir enerji kaynağı sağlamak adına L-glutamin’li tercih edilmiştir. DMEM temel olarak hücreler için gerekli olan besin kaynağını sağlamak adına, FBS ve NCS temel olarak hücrelerin büyümeleri aynı zamanda çoğalmaları için önemli olan büyüme faktörleri ve proteinleri sağlamak adına son olarak ise Penisilin-Streptomisin temel olarak hücre kültürü sırasında herhangi bir bakteri veya mantar kontaminasyonu ile karşılaşmamamız adına önem arz etmektedir. Hücre kültürü süresince hücresel süreçleri kontrol altında tutmak adına hücreler, 37 C ve %5 CO₂ içeren CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler düzenli olarak takip edilerek yeterli konflüensiye ulaştıklarında deney planı uygulanmaya başlanmıştır. Tüm bu çalışma boyunca hücreleri gözlemlemek adına Inverted Mikroskoptan faydalanılmıştır.

2.2.2.1. Hücrelerin çözülmesi

İlk olarak stokta bulunan 3T3-L1 hücre hattına ait bir kriyoviyal buz içerisinde sıvı nitrojenden çıkarılmış ve çözülmesi beklenmiştir. kriyoviyalin çözülmesi beklenirken hücreleri transfer edeceğimiz T25 flaska 15-20 dk kadar su banyosunda ısıtılmış GM eklenmiş ve inkübatöre kaldırılmıştır. Hücrelerin çözülmesiyle beraber hücreler bir falcon tüpe aktarılmış ve üzerine eklenen GM ile homojenize edilerek hazırlanmış olan flaska aktarılmıştır. Hücreler flaska transfer edildikten sonra tabana tek sıra halinde yerleşmelerini sağlamak adına hafifçe sallanmıştır. Sonrasında flask tekrar CO₂ inkübatörüne kaldırılmıştır. Hücrelerin çözülmesi basamağında hücrelerin iyice homojenize edilmesine böylelikle hücrelerin tek bir yerde üst üste büyüyerek ve çoğalarak tek tabaka formunu kaybetmemesine dikkat edilmiştir.

2.2.2.2. Hücrelerin büyütülmesi ve pasajlanması

Hücrelerin yeterli konflüensiye ulaşana kadar yaklaşık her iki günde bir medium rengi, hücre yoğunluğu, ölü hücre miktarı, besiyeri son değiştirilme tarihi de göz önüne alınarak eski besiyeri uzaklaştırılmıştır. Eski besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkanmıştır ve PBS uzaklaştırılarak taze besiyeri eklenmiştir. Hücreler yeterli konflüensiye ulaştıklarında ise deney planına göre yeni bir flaska, 24 well plate’e ya da 96 well plate’e pasajlanması gerçekleştirilmiştir.

Pasajlama işlemi içi öncelikle eski besiyeri uzaklaştırılmıştır. Sonrasında PBS ile bir veya birden fazla kez yıkanarak üzerlerine flaskın hacmine göre, bizim çalışmamızda kullandığımız T25 flaskı için 1 ml, tripsin eklenmiş, hücre tabanına iyice yayılmış ve sonrasında enzimin aktivitesini artırmak adına inkübatöre kaldırarak yaklaşık 4 dakika beklenmiştir. Tripsin burada hücre hattımız adherent yani flask yüzeyine bitişik olarak büyüyüp çoğaldıkları için onları flask tabanından kaldırmak adına kullanılmıştır. Tripsin aktivitesi hücrelerin inkübe edildikleri sıcaklık ve karbondioksit oranlarında arttığı için burada 4 dakika kadar bekletilmiştir. Hücrelerin flask tabanından ayrılıp ayrılmama durumu Inverted Mikroskop ile kontrol edilmiş olup hücrelerin tabandan tam olarak ayrılmadıkları anlaşıldığı durumda ise karbondioksit inkübatöründe 4 dakikaya ek olarak bekletilebilmektedir. Hücrelerin flask tabanından ayrıldığı kesinleştiğinde ise enzim aktivitesini inhibe etmek adına eklenen tripsinin en az iki katı olacak şekilde GM eklenmiştir. Sonrasında tabanda hala yapışık olan hücreleri kaldırmak ve iyice homojenize etmek adına al ver yapılarak hücrelerin tek tek bulunduğu bir süspansiyon (Single Cell Suspension) hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonu 15 ml'lik bir falcona alınmış ve daha sonrasında 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet'in üzerine ise deney planında hesaplanan pasaj sayısına uygun olarak GM eklenmiş ve iyice homojenize edilmiştir. Son olarak ise daha önceden içerisine bir miktar GM eklenmiş ve karbondioksit inkübatöründe ısıtılmaya bırakılmış flask ve 24 well plateler içerisine eklenmiştir. flask ve 24 well plate hafifçe aşağı yukarı yapılarak hücrelerin homojen dağılımı sağlanmıştır. Hücreler tüm bu işlemlerin ardından Inverted Mikroskop ile incelenmiş ve karbondioksit inkübatörüne kaldırılmıştır.

2.2.2.3. Hücrelerin dondurulması

Hücreleri dondurma işlemi artık daha fazla hücreye ihtiyaç duyulmadığında veya hücre sayısının çok fazla olduğu durumlarda gerçekleştirilebilir. Böylelikle sonraki çalışmalar için stok sağlanmış olur. Dondurma işlemi pasajlama işlemine çok benzer bir protokol ile gerçekleştirilir. Öncelikle eski besiyeri uzaklaştırılmış hücreler ve PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında tripsin eklenerek hücreler flask yüzeyinden kaldırılmıştır. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırılmıştır ve pellet üzerine pasajlama işleminden farklı olarak hazırlanan freezing medium (dondurma mediumu) eklenmiştir. Dondurma mediumu hazırlanan total medium hacminin 1/10'u kadar

DMSO (Dimetil Sülfoksit) eklenmiştir geri kalan ise GM ile tamamlanmıştır. Hazırlanan dondurma mediumu hemen buz içerisine alınmıştır pellete ekleninceye kadar orada bekletilmiştir. Pellet ile dondurma mediumu iyice homojenize edildikten sonra her vial 1 ml olacak şekilde eklenmiştir. Dondurma protokolünde hücrelerin aşamalı dondurulması gerekmektedir. Eğer aşamalı dondurulma yapılmazsa hücreler bir anda çok düşük bir sıcaklığa maruz kalacak bu nedenle ölümler gerçekleşecektir. Vialler öncelikle -20°C de 2 saat kadar bekletilmiştir sonrasında -196 °C olan sıvı nitrojen tankına transfer edilmiştir.

2.2.2.4. Hücrelerin diferansiasyonu

Farklılaştırma işlemi için 24-well plateler kullanılmıştır. 24-well platelere pasajlanan hücreler %70 konfüliensiye ulaştıklarında farklılaştırma işlemine başlanmıştır. Hücrelerin %70 konfüliensiye ulaşmaları farklılaştırma açısından önemlidir eğer yoğunluk daha az olursa hücrelerin farklılaşması daha zor olmaktadır, yoğunluk daha fazla olursa farklılaştırma protokolü bitene kadar hücrelerin yoğunluğa bağlı flask tabanından kalkmaları ve buna bağlı olarak ölümlerine sebep olur. 24-well plateler yeterli konfüliensiye ulaştıktan sonra öncelikle hücrelere iki gün süreyle maruz kalacakları pre-diferansiasyon mediumu verilmektedir. Pre-diferansiasyon mediumu hazırlanan DM içerisine konsantrasyonları 1,0 µM Dekametazon, 0,5 mM isobütilmetilksantin (IBMX), 1,0 µg/mL insülin olacak şekilde eklenerek hazırlanmalıdır. Halihazırda bulunan bu kimyasalların konsantrasyonları pre-diferansiasyon mediumu içerisinde yukarıda belirtilen gibi olacak şekilde hesaplanmasıyla 1 ml DM içerisine 0.1 µL insülin, 11.1 µL IBMX, 20 µL Dekametazon olacak şekilde hazırlanmıştır. Farklılaştırma protokolünün başlaması için öncelikle eski besiyeri uzaklaştırılmıştır sonrasında deney planına göre GM kontrol grubu hariç farklılaşması gerek diğer tüm kuyulara son hacmi 500 µL olacak şekilde pre-diferansiasyon mediumu verilmiştir. Verilen bu pre-diferansiasyon mediumu 48 saat tutulmuş ve sonrasında uzaklaştırılarak diferansiasyon mediumuna geçilmiştir. Diferansiasyon mediumu DM içerisinde konsantrasyonu 1,0 µg/mL insülin olacak şekilde yani 1 ml DM içerisine 0.1 µL insülin eklenmesi ile hazırlanmıştır. Diferansiasyon mediumu yağ damlacıkları iyice belirginleşinceye yani farklılaşma tamamlanıncaya kadar her 48 saatte bir değiştirilmiştir. Tüm bu değişimler Inverted Mikroskop ile gözlemlenmiştir.

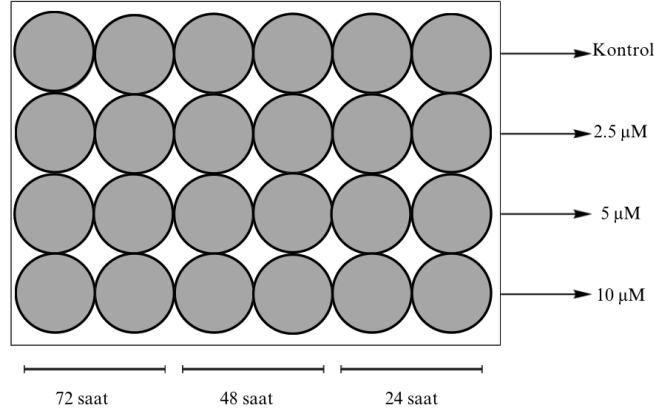
2.2.3. Safranal'ın hücrelerde toksik olmayan konsantrasyonunun belirlenmesi

Ticari olarak satın alınan ve gerekli hesaplamaları yapılarak ara stoğu hazırlanan safranal'ın hücrelerin canlılığı üzerine etkisini ve hücrelerde yaratacağı toksisiteyi belirlemek amacıyla 24-well plate ve 96-well plateler üzerinde denemeler yapılmıştır. Bu denemeler yapılırken parametreler 24, 48, 72 saat ve 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M olarak belirlenmiştir.

2.2.3.1. 24-well plate gözleme dayanan toksisite çalışmaları

Hücreler yaklaşık olarak %70'lik bir konfüansi gösterdiklerinde 24-well plate de toksisite deneylerine başlanmıştır. Bu işlem için total 20 ml hacme 1000 μ M konsantrasyona sahip +4°C'de muhafaza edilen safranal ara stoğu kullanılmıştır. 24-well plate'in her kuyucuğuna eklenecek olan maksimum hacim 500 μ L olarak belirlenmiştir. Deney planı kurulurken her bir konsantrasyon için altı kuyu kullanılması kararlaştırılmıştır. Bu durum her bir konsantrasyon için eşit koşullara sahip altı örneğe sahip olmak anlamına gelmektedir. Bu sebeple 3 ml safranal içeren besiyeri deneyin yürütülmesi için yeterli olmaktadır ancak pipetaj kaybı olma veya herhangi bir sorunla karşılaşma ihtimalini göz ardı etmek adına her konsantrasyon için son hacmi 5 ml olacak şekilde safranal içeren besiyeri hazırlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında literatür taraması ile 2.5 μ M, 5 μ M ve 10 μ M olmak üzere üç konsantrasyonun hücreler üzerinde denenmesine karar verilmiştir. Bu konsantrasyonların aynı zamanda 24, 48 ve 72 saat gibi diğer bir parametre ile desteklenmesi sağlanmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılacak olan GM içerisine kullanılan safranalin ticari olarak satın alınması yani herhangi bir çözücü ile muamele edilmemesi sebebiyle ekstra bir madde eklenmemiştir. 2.5 μ M konsantrasyona sahip besiyerini hazırlamak için 5 ml GM içerisine 12,5 μ L safranal, 5 μ M konsantrasyona sahip besiyerini hazırlamak için 5 ml GM içerisine 25 μ L safranal, 10 μ M konsantrasyona sahip besiyerini hazırlamak için 5 ml GM içerisine 50 μ L safranal eklenmiş ve böylelikle uygulanacak olan safranalli besiyerleri hazır hale getirilmiştir. 24-well plate ile gözleme dayalı toksisite deneyleri sonuçların güvenliği açısından üç kere denenmiş olup bu işlem her bir 24-well plate denemesi öncesi tekrarlanmış yani safranalli besiyeri taze olarak hazırlanıp uygulanmıştır. Ancak her bir deneme için 3 saat parametresi bulunduğundan dolayı ilk olarak 72 saat maruz kalacak hücrelere işlem yapılmış sonrasında kalan besiyerleri bir sonraki saat uygulamasına dek

alüminyum folyo ile kapatılarak +4 °C’de saklanmıştır. İlk olarak 72 saat maruz bırakma işlemi yapıldıktan sonra sırasıyla 48 saat ve 24 saat için de aynı işlem uygulanmıştır. Bu çalışma kapsamında uygulanan deney planı Şekil 2.1.’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. 3 Farklı doz ve saat ile safranal konsantrasyonunu belirlemede 24-well plate uygulamasına ait deney planı

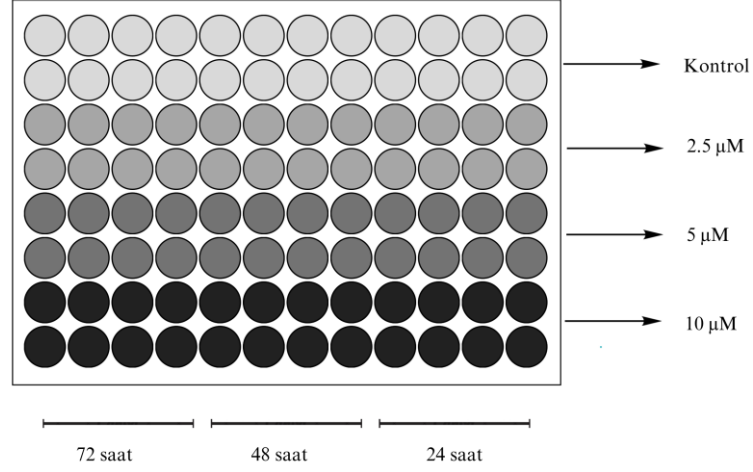
2.2.3.2. 96-well plate safranal uygulaması ve MTT testi

MTT reaktifi (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür), üç aromatik halka ile çevrili olan ve dört azot atomu içeren pozitif yüklü bir tetrazolium tuzudur. MTT'nin hücre tarafından indirgenmesi, tetrazol halkasının bozularak mor-mavi suda çözünmeyen formazan adı verilen bir molekülün oluşumuna sebep olur. MTT kimyasalı, lipofilik bir yapıya sahiptir. Bu nedenle hücre ve mitokondri iç zarından geçerek canlı hücrelerde formazana indirgenmektedir. Bu formazan oluşumu ile kolorimetrik tabanlı bir ölçüm yapılır. DMSO ile formazan kristallerinin çözünmesi sağlanır ve böylelikle spektrofotometrik ölçüm yapılır. MTT testi ile hücrelerin metabolik aktiviteleri analizi edilebilir bu nedenle MTT hücre canlılığının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir testtir (Ghasemi vd., 2021).

96-well plate’e pasajlanması gerçekleştirilen hücrelerin yaklaşık iki günlük sürenin ardından yeterli konfüliensiye ulaşmasıyla beraber safranal’ın hücre canlılığına etkisini incelemek ve kullanılacak safranal dozuna, 24-well plate deneyleri de göz önünde bulundurularak, kesin olarak karar vermek adına MTT uygulaması yapılmıştır. MTT uygulaması 24-well plate deneylerine benzer şekilde 24, 48, 72 olmak üzere üç saat ve 2.5 µM, 5 µM, 10 µM olmak üzere üç konsantrasyonun denemesi

gerçekleştirilmiştir. MTT testi kapsamında uygulanan deney planı aşağıda yer alan Şekil 2.2’de verilmiştir. Bu konsantrasyonlara sahip safranal içeren besiyerleri daha öncesinden hazırlanan safranal ara stoğu kullanılarak yapılmıştır. 96-well plate için bir kuyunun alabileceği maksimum hacim 100 µL olarak belirlenmiştir. Toplamda her konsantrasyon grubu için 2.4 ml safranal içeren besiyerine ihtiyaç duyulmuştur ancak pipetaj kaybını veya diğer hataları önlemek adına her grup için 3’er ml besiyeri hazırlanmıştır. Bu durumdan farklı olarak kontrol olarak planlanan 24 kuyuya toplam 2.4 ml GM eklenmiştir. Kontrol grubuna sadece GM eklenmesi safranal bileşiğinin ticari olarak satılması ve sıvı olarak paketlenmesidir. Geriye kalan kuyulardan 24’üne ise 2.5 µM konsantrasyonunu denemek adına 3 mililitre GM içerisine 7,5 mikrolitre safranal ile hazırlanmış besiyeri, diğer 24 kuyuya 5 µM konsantrasyonunu denemek adına 3 mililitre GM içerisine 15 mikrolitre safranal ile hazırlanmış besiyeri, son kalan 24 kuyuya ise 3 mililitre GM içerisine 30 mikrolitre safranal ile hazırlanmış besiyeri eklenmiştir. Uygulamaya ilk olarak 72 saatten başlanmıştır sonrasında besiyerleri alüminyum folyo ile kapatılarak +4°C’de sonraki saatlik uygulama için muhafaza edilmiştir. BIOTIUM (10059) firmasına ait MTT testi kullanılmıştır. MTT testi, konsantrasyonu 5 mg/ml olacak biçimde daha önceki çalışmalar için hazırlanmış olan MTT kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan MTT’nin hazırlanışı şu şekildedir; tartılan 1 g MTT üzerine 50 ml PBS eklenmiş, ısıtıcı karıştırıcıda yaklaşık yarım saat karıştırılmış ve sonrasında tüplere 500 µL olarak paylaştırılmıştır. MTT ışığa duyarlı olduğundan dolayı hazırlanış aşamasında alüminyum folyo ile kapatılmıştır. MTT uygulanması sırasında izlenen protokol aşağıda verilen şekildedir.

1. Önceden hazırlanmış ve 500 µL şeklinde bölünmüş olan MTT solüsyonu ve 9.5 ml GM karıştırılarak MTT çalışma solüsyonu hazırlandı.
2. Eski besiyeri uzaklaştırıldı. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan MTT solüsyonu her kuyucuğa 100 mikrolitre olacak şekilde verildi.
3. 96-well plateler inkübatöre kaldırılıp 4 saat inkübasyona bırakıldı.
4. Ardından MTT içeren solüsyon da platelerden uzaklaştırıldı ve son olarak tüm kuyulara 100 mikrolitre DMSO eklendi.
5. DMSO içeren plateler karıştırıcı da 200 rpm de 5 dk çalkalandı ve spektrofotometrede 570 nm’de ölçüm gerçekleştirildi.
6. Sonuçlar ttest ile analiz edilmiştir.



Şekil 2.2. 3 farklı doz ve saat ile safranal konsantrasyonunu belirlemede 96-well plate uygulamasına ait deney planı

2.2.4. Hücrelerden RNA izolasyonu

Farklılaştırma protokolünün uygulanmasının ardından lipid akümüasyonunun gerçekleşmesi ve yağ damlacıklarının yoğunlaşmasıyla beraber 3T3-L1 hücreleri preadiposit morfolojilerinden uzaklaşarak olgun adiposit morfolojisi sergilemeye başlar. Bu farklılaşmanın yeterli miktarda olması yani deney modelinin oluşturulmasıyla beraber belirli deneyler ile belirlenen uygun saat ve konsantrasyonun hücrelere uygulanması gerçekleştirilmiştir. Bu uygulama sonrasında hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu dört kuyunun Oil Red O boyama işlemi için ayrılmasından sonra kalan 20 kuyu üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu izolasyonla beraber GM ve DM kontrolden 2'şer örnek, safranal uygulanan kuyulardan ise 3'er örnek elde edilmiştir. RNA izolasyonu GeneAll firmasının 301-001 katalog numarasına sahip RiboEx ürünü ile gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonunda protokol aşağıda verilen şekilde uygulanmıştır.

- 1-İlk olarak hücreler üzerinde bulunan besiyeri uzaklaştırılmıştır. Sonrasında işlem yapılacak olan kuyular 2 defa PBS ile yıkanmış ve PBS uzaklaştırılmıştır.
- 2-Kuyulara kuyunun hacmi ile orantılı miktarda RiboEx eklenmiştir ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 3-Her kuyu iyice karıştırılmış ve her iki kuyucuk bir ependorfa alınmıştır.
- 4-Ependorflara ise homojenata eklenen RiboEx miktarının 1/5'i kadar kloroform eklenmiş ve 15 sn kadar sertçe vortekslenmiştir. Sonrasında 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.

- 5-Tüpler +4 °C 12.000 x g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Bu aşamayla beraber 3 faz oluşmakta bu fazlardan biri hücrelerin RNA'sının hücrenin diğer kısımlarından ayrıştığı fazdır ve bu faz en üstte yer alan şeffaf kısımdır.
- 6-En üstte yer alan şeffaf süpernatant diğer fazlar ile karıştırılmadan hassas bir şekilde başka bir tüpe alınmıştır.
- 7-Yeni tüplerin içerisine RiboEx miktarının 1/2'si kadar izopropil alkol eklenmiş ve çözelti 3-5 kez ters çevrilerek karıştırılmıştır. Sonrasında oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir.
- 8-İnkübasyonun ardından tüpler +4°C 12.000 x g'de 10 dakika santrifüjlenmiştir.
- 9-Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atılmıştır.
- 10- RNA pelletini yıkamak için %70'lik etanol eklenmiş ve tüpler 4°C 7500 x g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.
- 11- Etanol uzaklaştırılmış ve tüpler ağzı açık şekilde korunaklı bir ortamda bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
- 12- Ertesi sabah tüplerin içerisine 50 µL ddH₂O eklenmiş ve 56 °C 10 dk su banyosunda bekletilmiştir.
- 13- Örnekler bir sonraki deneye kadar -20 °C'ye kaldırılmıştır.

2.2.5. Oil Red O boyama

Oil Red O stok solüsyonu, 60 mg olacak şekilde hassas terazide ölçülen ve toz halde bulunan Oil Red O boyasının üzerine 20 ml %100'lük izopropil alkol eklenmesiyle hazırlanmıştır. Çalışma solüsyonu, çalışmadan yaklaşık yarım saat kadar önce stok solüsyonundan 3 ml ve ddH₂O dan 2 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çalışma solüsyonu filtreden geçirilmiştir ve boyama için hazır hale getirilmiştir. Oil Red O boyaması yapılırken aşağıda verilen protokol uygulanmıştır.

- 1.Hücreler üzerinde bulunan medium uzaklaştırılmıştır ve PBS ile yıkanmıştır.
- 2.Her kuyuya 500 µL formalin eklenmiş ve 100 rpm'de 45 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- 3.Formalin uzaklaştırılmıştır. Her kuyuya 500 µL %60 izopropil alkol eklenmiş ve 5 dk 100 rpm'de inkübe edilmiştir.

4. İzopropil alkol uzaklaştırılmıştır. Tekrar homojenize etmek adına vortekslenen boya her kuyuya 500 μL olacak şekilde eklenmiş ve 15-20 dk süreyle çalkalayıcıda 100 rpm’de inkübe edilmiştir.
5. Boya uzaklaştırılmış ve kuyular 2 ila 5 kez arası çıkan su şeffaf olana kadar 500 μL ddH₂O ile yıkanmıştır.
6. Her kuyuya 150 μL hematoksilen eklenmiştir ve 1 dk 100 rpm’de inkübe edilmiştir.
7. Hematoksilen uzaklaştırılmıştır ve yine kuyular 2 ila 5 kez arası çıkan su şeffaf olana kadar 500 μL ddH₂O ile yıkanmıştır.
8. Boyama yapılan kuyulara 500 μL ddH₂O eklenmiş ve mikroskopta gözlem yapılmıştır.

2.2.6. RNA miktarının ve kalitesinin belirlenmesi

2.2.6.1. Spektrofotometrik deneyler

Deneyler sonucu elde edilen RNA’ların konsantrasyon, 260/280 ve 260/230 değerlerini ölçmek amacıyla yani herhangi bir nükleik asit, protein ya da kimyasal kontaminasyona sahip olup olmadığını değerlendirmek adına μDrop analizi gerçekleştirilmiştir. Ölçüm için μDrop plate’i üzerinde yer alan her kuyuya RNA örneklerinden 4 μL eklenmiştir. Blank olarak ddH₂O kullanılmıştır. Ölçüm işlemi cihazın, bağlı olduğu bilgisayarda bulunan programına gerekli protokollerin girilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucu elde edilen veriler analiz edilmiş ve sonraki deneylerde kullanılabilirliğine karar verilmiştir.

2.2.6.2. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi izolasyon sonucu elde edilen RNA gibi nükleik asit moleküllerinin saflığı, miktarı, ağırlığı ve alt tipleri hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla kullanılan moleküler bir yöntemdir. Bu yöntem temelde nükleik asit molekülünün negatif yüklü olmasından faydalanır. Negatif yüklü molekül güç kaynağı ile oluşturulan elektrik alan içerisinde negatif kutuptan pozitif kutba doğru hareket eder ve bu hareket ile moleküler ağırlığa dayalı bir ayrışma gerçekleşir. Bu ayrışma durumu, yürütülen jelin EtBr (Ethidium Bromide) içermesi ve bu etidyum bromürün

UV altında ışıma yapması sebebiyle UV transillüminatör adı verilen bir cihaz ile tespit edilebilmektedir (Koontz, 2013).

Tez çalışması kapsamında RNA örnekleri agaroz jelde yürütülmüştür. Jelin hazırlanması amacıyla 100 ml TAE buffer içerisine 1 g agaroz eklenmiştir ve mikrodalgada şeffaf bir görüntü elde edilinceye kadar kaynatılmıştır. İlk sıcaklığı gittikten sonra 10 µL EtBr (Ethidium Bromide) eklenmiş sonrasında hafifçe karıştırılmış ve elektroforez tankında yer alan tepsiye dökülmüştür. Jel polimerize olmadan taraklar takılmış ve herhangi bir baloncuk görüldüğü durumda baloncuk pipet ucu yardımıyla elimine edilmiştir. Jel polimerize olduktan sonra üzerine tankı dolduracak kadar TAE buffer eklenmiş ve taraklar yavaşça çıkartılmıştır. 2 µL RNA örneği, 2 µL loading dye, 8 µL ddH₂O iyice karıştırılmış ve 10 µL çekilerek jele yüklenmiştir. Bu işlem her örnek için ayrı ayrı yapılmıştır. Hibrigen firmasına ait 1 kb DNA ladder kullanılmıştır. DNA ladder ilk kuyuya 4 µL olacak şekilde yüklenmiştir. Örnekler ve ladder 1 saat 60 Volt'ta yürütülmüştür. Örneklerin ve ladderin daha iyi açılması adına bu süreye 30 dk eklenmiştir. Jelin görüntülenmesi UV Transillüminatör ile yapılmıştır.

2.2.7. cDNA sentezi

Real-time PCR reaksiyonlarında kullanabilmek adına, spektrofotometrik ölçümlerden elde edilen konsantrasyon verileri dikkate alınarak, öncelikle tüm RNA örneklerinin ortak bir hacim ve ortak bir konsantrasyonda sabitlenmeleri adına seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda RNA örnekleri seyreltilmiş ve total hacimleri 50 µL, konsantrasyonları 100 ng/ µL olacak şekilde ayarlanmıştır.

cDNA sentezi One Script Plus cDNA Synthesis kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit içerisinde yer alan maddeler ve reaksiyonda kullanılmış olan maddelerin hacimleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 2.3). cDNA sentez kiti ve seyreltilmiş RNA örnekleri buz içerisinde -20°C'den çıkartılmış ve çözümleri sağlanmıştır. Hangi bileşenden ne kadar ekleneceği daha öncesinden hesaplanmıştır. Çözünme sağlandıktan sonra tüpler içerisine belirlenen miktarlarda örnekler ve cDNA sentezi için gerekli bileşenler eklenmiştir. Bu çalışma kapsamında 40 örnek için 42 X master mix hazırlanmıştır. Bu master mix her tüpe 15 µL olacak şekilde eklenmiş sonrasında her tüpün üzerine 5 µL RNA eklenmiş ve reaksiyon hacmi her tüp için total 20 µL'ye tamamlanmıştır.

Ardında tüpler 55°C'lik su banyosuna alınmış ve burada 15 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyonun devam etmesini önlemek adına tüpler 55°C'lik su banyosunun ardından 85°C'lik su banyosuna alınmış ve burada 5 dk inkübe edilmiştir. Tüpler oda sıcaklığına çıkarılmış yeterli miktarda soğuduktan sonra Real-time PCR deneylerinde kullanmak adına 1/8 oranında yani her örnek için 5 µL cDNA + 35 µL ddH₂O olacak şekilde seyreltilmiş ardından muhafaza etmek adına -20°C sıcaklığa kaldırılmıştır.

Çizelge 2.3. cDNA Sentezi için kullanılan maddeler ve miktarları

Bileşenler	Hacim	Son Konsantrasyon
One Script Plus R Tase (200 U/µL)	1 µL	200 U/ reaksiyon
Nuclease Free Water	8 µL	-
5X RT Buffer	4 µL	1X
Random Primers	1 µL	0.5 µM
dNTP (10 mM)	1 µL	500 µM
RNA (100ng/µL)	5 µL	500 ng/µL

2.2.8. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) deneyleri

Ampliqon RealQ Plus 2X Master Mix Green kullanılarak Real-time PCR deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneyleri gerçekleştirmek adına tüm bileşenler ve cDNA'lar buz içine alınmış ve çözölmüştür. Gerekli hesaplamaların yapılmasının ardından iyice homojenize edilen bileşenler tüp içerisine alınarak denenecek olan primer için master mix hazırlanmıştır. cDNA örnekleri PCR tüplerine eklendikten sonra üzerlerine hazırlanan ve iyice homojenize edilen master mix eklenmiştir. Reaksiyon kurulurken kullanılan bileşenler ve ne kadar kullanıldıkları aşağıda yer alan Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. RT-PCR reaksiyonu için kullanılan maddeler ve miktarları

Bileşenler	Hacim	Son Konsantrasyon
Ampliqon RealQ Plus 2X Master	5 µL	1X
Nuclease Free Water	2 µL	-
Primer Forward (10 pmol/µL)	0.5 µL	0.5 (10 pmol/µL)
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0.5 µL	0.5 (10 pmol/µL)
cDNA (15 ng/µL)	2 µL	15 ng/µL

Reaksiyon hazırlandıktan sonra cihazdan seçilen ve bu bağlamda gerçekleştirilen protokol aşağıda verilmiştir (Çizelge 2.5)

Çizelge 2.5. RT-PCR deney protokolü

Aşama	Döngü Sayısı	Sıcaklık/Zaman
Ön İnkübasyon (Preincubation)	1	95 °C / 900 saniye
		95 °C / 30 saniye
3 Aşamalı Amplifikasyon	45	50 °C-58 °C / 300 saniye
		72 °C / 30 saniye
		95 °C / 10 saniye
Erime	1	65 °C / 60 saniye
		97 °C / 1 saniye
Soğuma	1	37 °C / 30 saniye

2.2.9. RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm primerlere ait RT-PCR verileri değerlendirilirken $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile elde edilen PCR sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. Bu yöntemde temel olarak housekeeping genin ve hedef genin CT (threshold cycle) değerleri kullanılarak hesaplama yapılmaktadır. Çalışmada housekeeping gen olarak 18S kullanılmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirilecek GM kontrol, DM kontrol, 2.5 μ M ve 5 μ M olmak üzere dört grup bulunmaktadır. Her grup için 2 set total dört örnek kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında ilk olarak housekeeping gen olan 18S primerinin deneyleri gerçekleştirilmiştir. Böylelikle değerlendireceğimiz örneklerimizde 18S primerinin ne kadar ifade edildiği tespit edilmiştir.

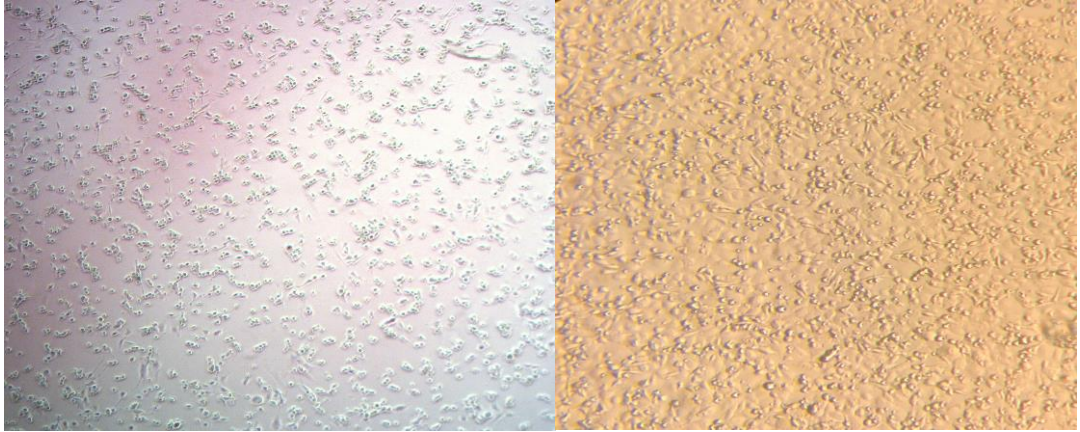
Hesaplama, housekeeping geninden elde edilen CT değerleri ile istenen genin CT değerlerinden çıkarılmasıyla elde edilen ΔCT değeri baz alınarak yapılmıştır. Kontrol olarak kullanılacak olan grubun ΔCT değerlerinin ortalaması alınmıştır ve bu ortalama her bir grupta yer alan örneklerden çıkarılmıştır. Böylelikle her örneğin $\Delta\Delta CT$ değeri elde edilmiştir. $\Delta\Delta CT$ değerlerinin $2^{\Delta\Delta CT}$ hesaplanmasıyla beraber $2^{-\Delta\Delta CT}$ değeri elde edilmiştir. Kontrol grubunda elde edilen $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerlerinin ortalaması alınmıştır ve ortalama 100 sayısına bölünmüştür. Ortaya çıkan sayı ise tüm gruplarda yer alan örnekler ile çarpılmıştır. Veriler ttest için hazır hale getirilmiştir. Kontrol grubu da dahil olmak üzere analiz gerçekleştirmek adına tüm grupların standart sapması, ortalaması ve standart hata değeri hesaplanmıştır. Hazırlanan veriler kullanılarak tüm grupların kontrol grubu ile arasında ttest gerçekleştirilmiştir. Ttest sonucu $p < 0.05$ olmasına göre değerlendirilmiş ve bu koşulu sağlayan sonuçlar anlamlı değerler olarak kabul edilmiştir. Anlamlı değerler ve analiz verileri dikkate alınarak bir grafik oluşturulmuş böylelikle PCR sonuçlarının analizi tamamlanmıştır.

3. BULGULAR

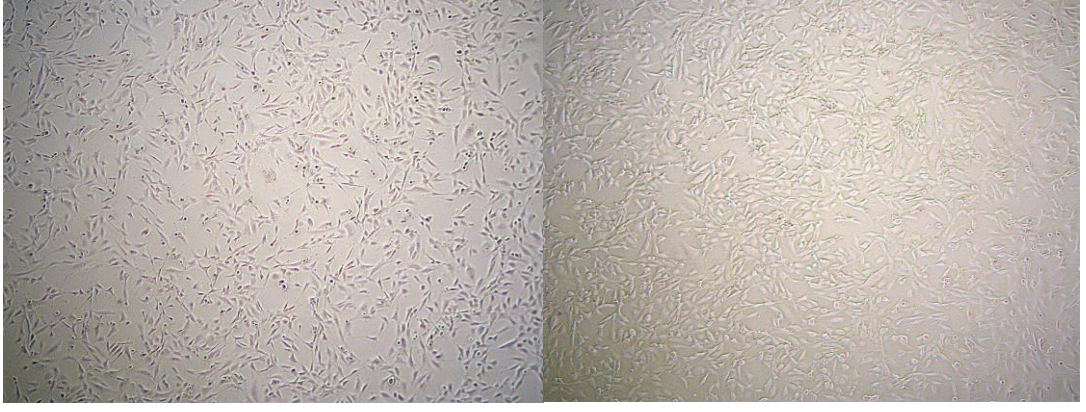
3.1. Hücre Kültürü Çalışmalarına Dair Bulgular

3.1.1. Hücrelerin çözülmesi, büyütülmesi ve pasajlanması

Hücreleri çözme, büyütme ve pasajlama işlemlerinin tamamı steril koşullarda deneyin işleyişine göre yapılmış olup uygulama sırasında olumsuz bir durumla karşılaşmamıştır. Hücreler buz içerisinde çözülmüş olup DMSO ile oda sıcaklığında uzun süre temas ettirilmemesine dikkat edilmiştir. Hücreleri çözme işleminin ardından bir gün sonrasında, DMSO uzaklaştırılmasını kapsamayan bir çözme protokolünün uygulanması sebebiyle besiyerleri değiştirilmiş olup hücrelerin fibroblastik yapıların geri kazanıp birbirleri ile kontak kurarak büyüme ve proliferasyon olmalarını tetiklemeleri amacıyla besiyerleri yaklaşık iki-üç günde bir değiştirilmiştir. Bu değişimde besiyeri rengi ve hücrelerin yoğunluğu göz önünde tutulmuştur. Şekil 3.1’de de görüleceği gibi hücreler çözüldüklerinde fibroblastik yapılarından uzak daha yuvarlak bir morfoloji sergilerken Şekil 3.2’de de görüldüğü gibi hücreler çözüldükten yaklaşık bir-iki gün sonra açılarak ve flask tabanına yapışarak fibroblastik morfolojilerini geri kazandığı anlaşılmaktadır.

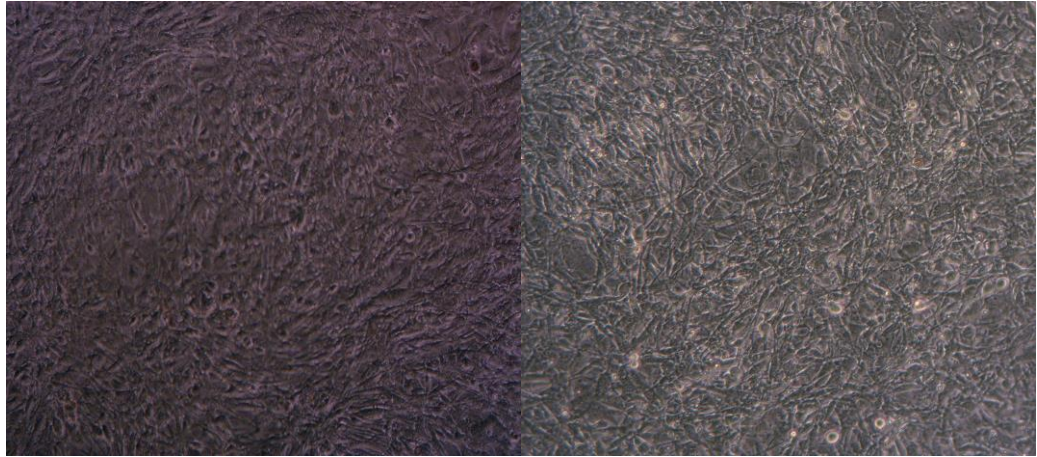


Şekil 3.1. Hücrelerin çözüldükten birkaç saat sonraki görüntüleri (4x büyütme)



Şekil 3.2. Hücrelerin çözüldükten birkaç gün sonraki görüntüleri (4x büyütme)

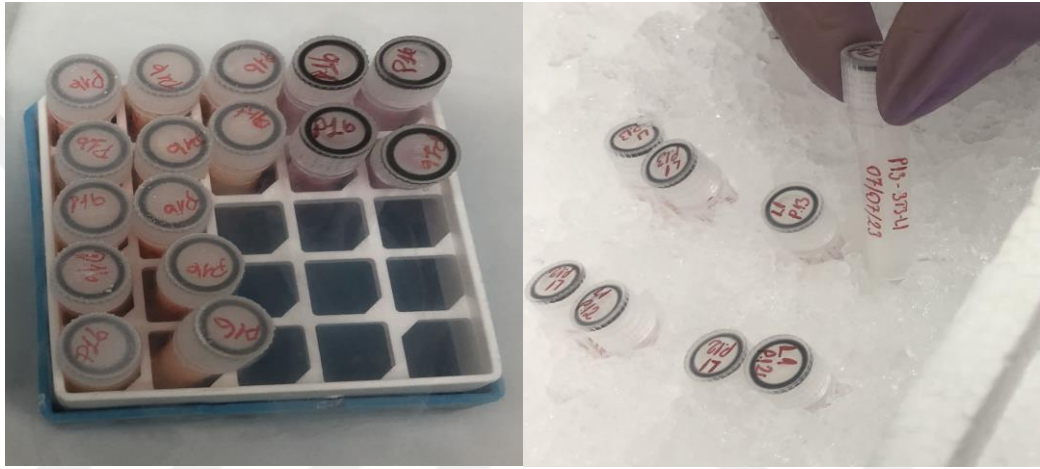
Hücrelerin çözülüp büyütülmesinin ardından çoğalmaları ve yeterli konflüensiye ulaşmalarıyla beraber deney planını uygulamak amacıyla pasajlanması gerçekleştirilmiştir. Pasajlama işlemi 2.2.2.2’de anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Pasajlama işlemi için hücrelerin yeterli konflüensisi %100 olarak değerlendirilmiştir. Pasajlama işleminin uygulanmaması yoğunluğa bağlı olarak flaskın tabanına tek sıra halinde dizilen hücrelerin üst üste binmesine ve bu nedenle flask tabanından koparak ölmelerine sebep olur. Bu kapsamda pasajlama yapılan hücrelerin görüntüleri Şekil 3.3’te verilmiştir.



Şekil 3.3. Pasajlama yapılan hücrelerin görüntüleri (10x büyütme)

3.1.2. Hücrelerin dondurulması ve saklanması

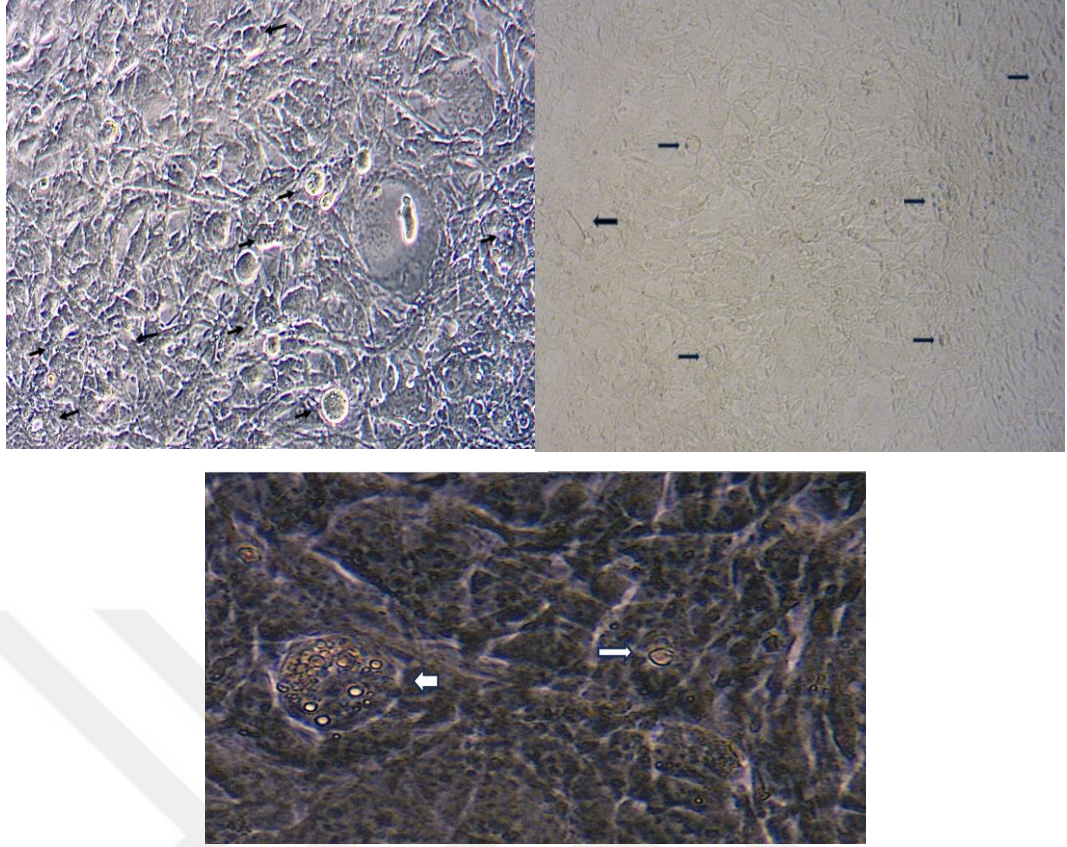
Hücreler %100 konfüliensiye ulaştıklarında pasajlanmış ve sonraki çalışmalarda da kullanılabilmesi amacıyla stoklanmıştır. Stoklama işlemi hücrelerin dondurulmasını kapsamaktadır. Dondurma protokolü ve bu protokol uygulanırken izlenen adımlar detaylı bir şekilde 2.2.2.3'te verilmiştir. Dondurma protokolü uygulanmasının ardından hücreler aşamalı olarak soğutulmuş nihai olarak sıvı nitrojen tankına alınmış böylelikle sonraki çalışmalarda da kullanılabilmesi adına -196°C 'ye kaldırılmıştır. Şekil 3.4'te sıvı nitrojene kaldırılan hücreler ait görüntüler yer almaktadır.



Şekil 3.4. Sıvı nitrojene kaldırılan hücreler ait görüntüler

3.1.3. Hücrelerin farklılaştırılması

Diferansiyasyon işlemi için hücreler 24-well platelere pasajlanmıştır. Pasajlama sonrasında hücreler well plate tabanında %70'lik bir kısmı doldurduğunda farklılaştırma işlemine başlanmıştır. Farklılaştırma işlemi 2.2.2.4'te detaylı bir şekilde anlatılmıştır. Bu protokol uygulanmasıyla beraber pre-adipositler yağ damlacıkları birikimiyle olgun adipositlere dönüşmüş deney modeli başarıyla uygulanmıştır. Hücrelerin farklılaştırmayla beraber fibroblastik morfolojilerini kaybederek lipid akümüasyonu ile olgunlaşmaları şekil 3.5'te verilmiştir.



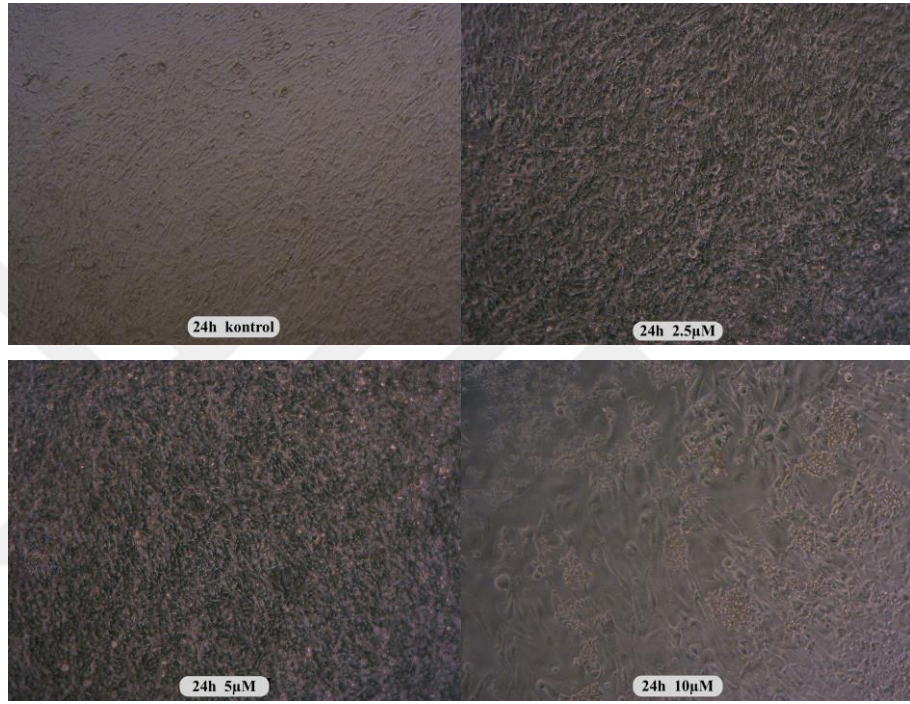
Şekil 3.5. Diferansiyasyon sonrası hücelere ait görüntüler (sırasıyla 20x, 10x ve 40x büyütme)

3.2. Safranıl Bileşğinin Uygulanabilmesi İçin Hücelerde Toksik Olmayan Konsantrasyonun Belirlenmesi Çalışmasına Ait Bulgular

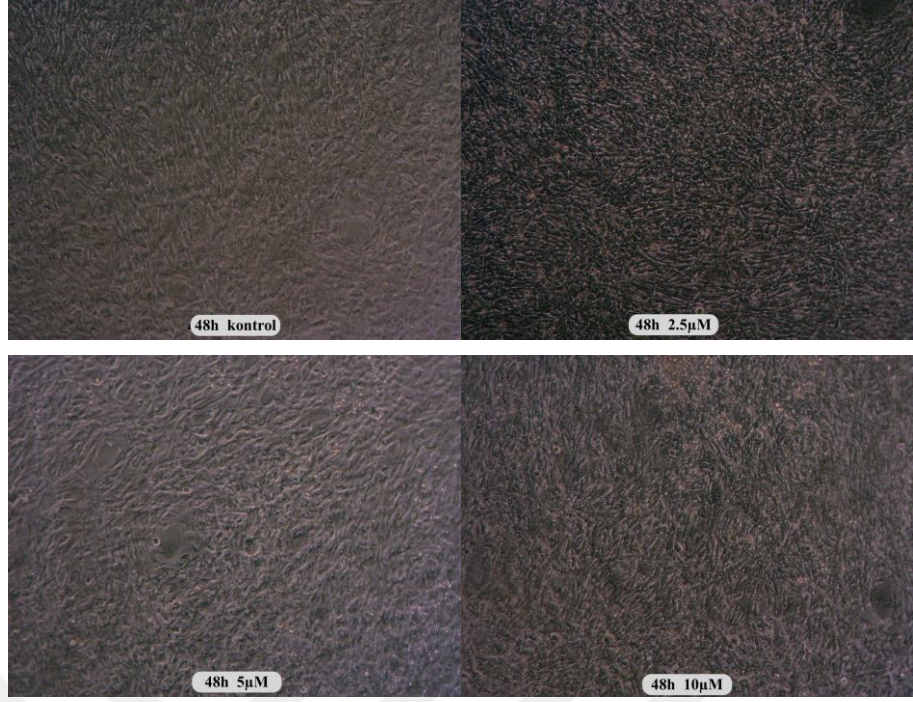
Safranıl bileşğinin hücelerde toksik olmayan dozunun ve saatin belirlenebilmesi amacıyla 24-well plate gözlem testi ve 96-well plate de MTT testi uygulanmıştır. Bu kapsamda 2.5 μ M, 5 μ M ve 10 μ M olmak üzere üç doz, 24, 48 ve 72 olmak üzere üç saat denemesi kurulmuştur. Gözleme dayalı test ve MTT testi 3'er kez denenmiştir ve sonuçlar incelendiğinde deney planından 72 saat ve 10 μ M dozun çıkarılmasına karar verilmiştir. Bunun sebebi 72 saatte hücelerde hem 24-well plate de hem de MTT sonuçlarında anlamlı hücre ölümleri olduğunun anlaşılmasıdır. 72 saatin hücelerin aynı mediumda kalması için uzun bir süre olduğu bu nedenle hücelerde gerçekleşen ölümün sebebi bu olabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda en yüksek dozda hücelerde kalkmalar görülmüştür bu nedenle bu dozun deney planından çıkarılması kararlaştırılmıştır.

3.2.1. 24-well plate gözleme dayalı test sonuçlarına ait bulgular

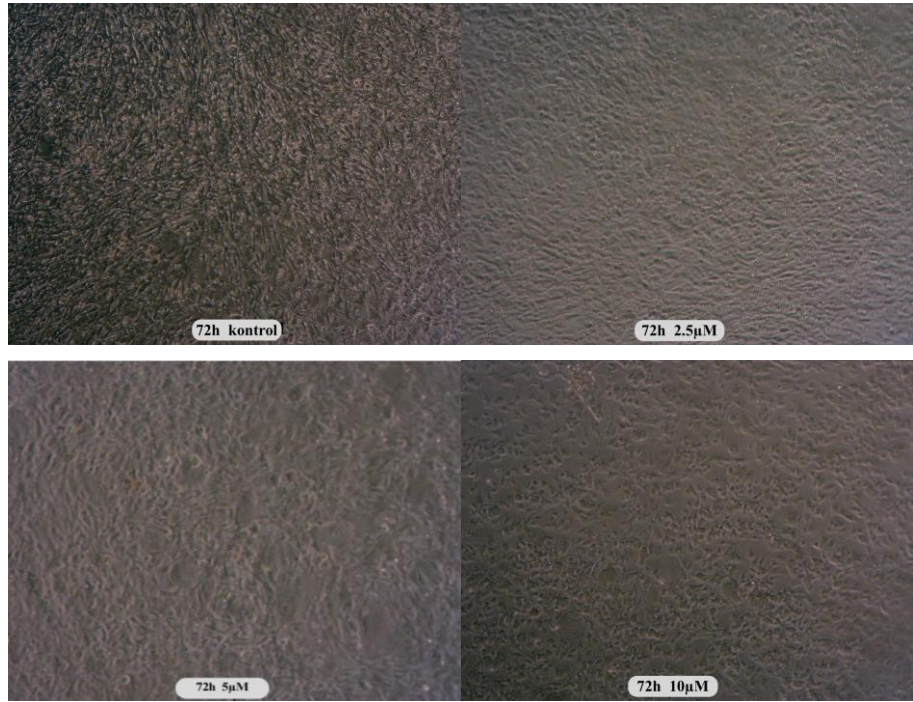
24-well plate gözleme dayalı konsantrasyon belirleme çalışmalarına dair izlenen protokol 2.2.3.1’de detaylı bir şekilde anlatılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen 24 saat verileri Şekil 3.6’da 48 saat verileri Şekil 3.7’de ve 72 saat verileri şekil 3.8’te verilmiştir.



Şekil 3.6. Safranal’e 24 saat maruz kalmış hücrelere ait görüntüler (10x büyütme)



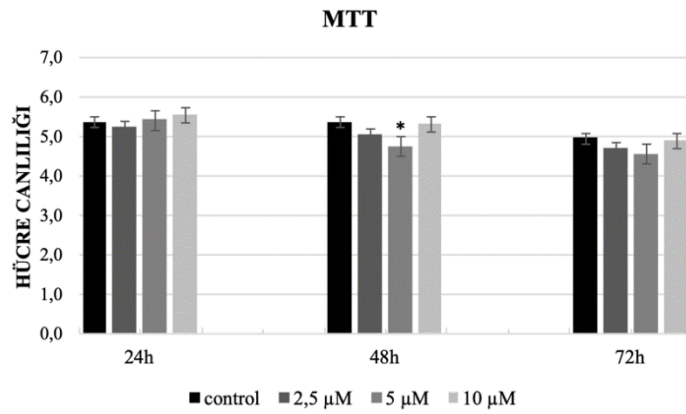
Şekil 3.7. Safranal'e 48 saat maruz kalmış hücrelere ait görüntüler (10x büyütme)



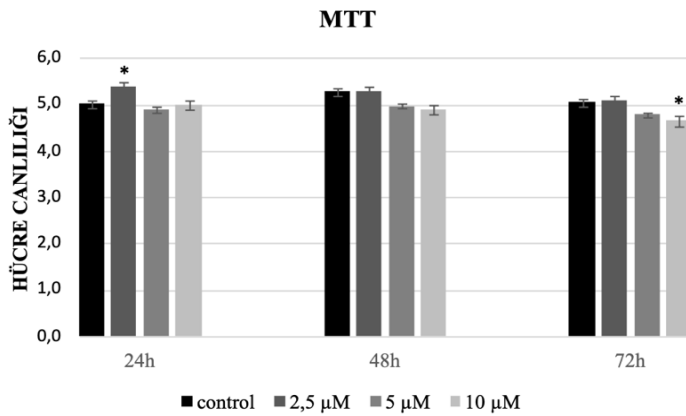
Şekil 3.8. Safranal'e 72 saat maruz kalmış hücrelere ait görüntüler (10x büyütme)

3.2.2. MTT testine ait bulgular

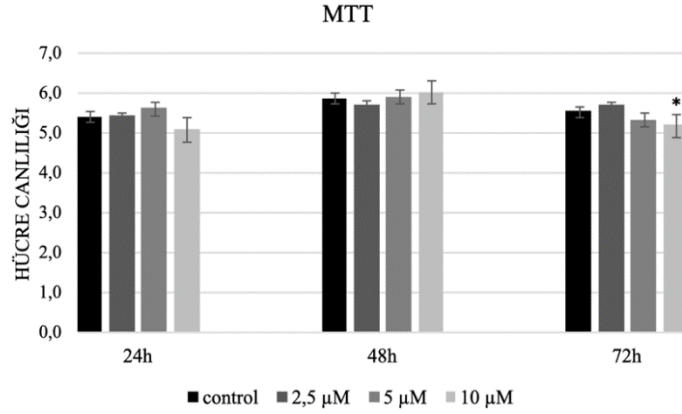
Safranal'ın hücre canlılığı üzerine etkisini incelemek ve hücrelerde toksik olmayan konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla 96-well plate de MTT testi gerçekleştirilmiştir. MTT testi uygulamasında izlenen protokol 2.2.3.2'de detaylı bir şekilde verilmiştir. Elde edilen veriler t-test ile analiz edilmiş olup anlamlılıkları değerlendirilmiştir. Analiz sonucu oluşturulan grafikler ilk deneme için Şekil 3.9'da ikinci deneme için Şekil 3.10'da üçüncü ve son deneme için Şekil 3.11'de verilmiştir. Grafiklerde anlamlılık durumu * işareti ile belirtilmiş anlamlılık değeri $p < 0.05$ olmasına göre değerlendirilmiş ve bu koşulu sağlayan sonuçlar anlamlı değerler olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.9. İlk MTT testi sonucu elde edilen grafik



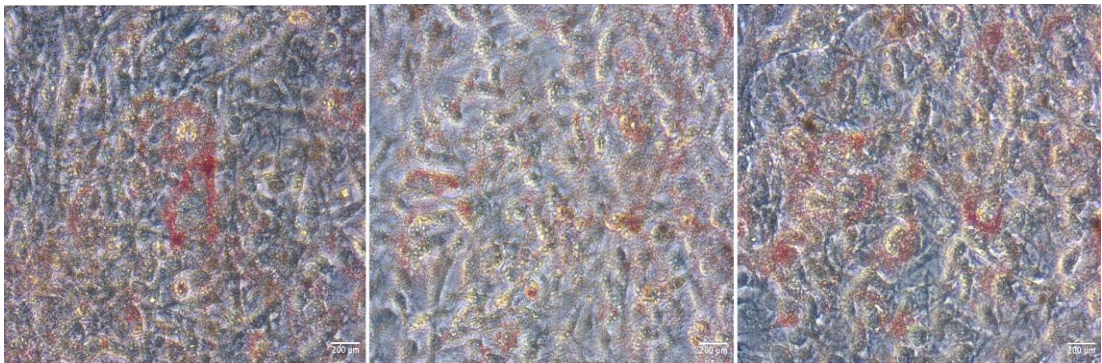
Şekil 3.10. İkinci MTT testi sonucu elde edilen grafik



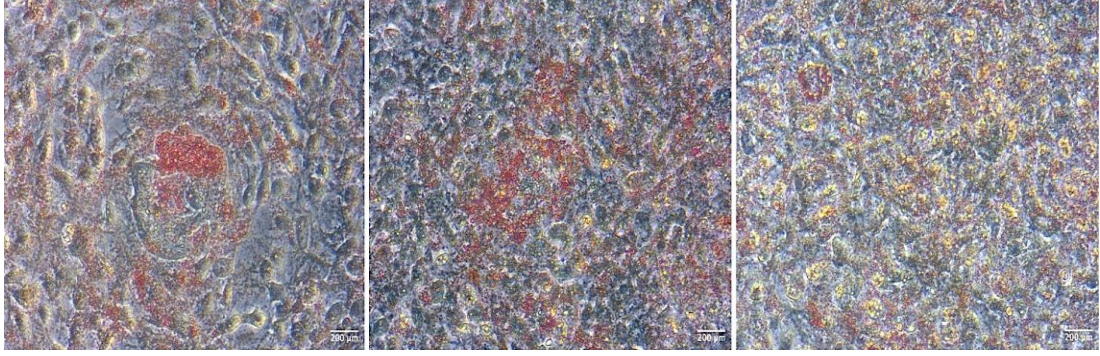
Şekil 3.11. Üçüncü MTT testi sonucu elde edilen grafik

3.3. Oil Red O Boyamasına Ait Sonuçlar

Oil Red O boyama ile yağ damlacıklarının görünür hale getirilmesi sağlanmıştır. Bu boyama ile yağ damlacıkları kırmızı renkli olarak görülmektedir. Hematoksilen boyama ile de hücre çekirdekleri boyanmıştır. Bu boyama ile elde edilen görüntüler incelendiğinde deney modelinin başarıyla uygulandığı ispatlanmıştır. Aynı zamanda safranal'ın lipid damlacıkları üzerinde azaltıcı bir etkisi olup olmadığını incelemek açısından veri sağlanmıştır. Şekil 3.12'de 24 saatlik Şekil 3.13'te 48 saatlik uygulama sonucu yapılan Oil Red O boyama görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 3.12. Farklaştırılmış hücelere sırasıyla kontrol, 2.5 µM ve 5 µM olmak üzere 24 saat safranal uygulaması sonrası yapılan boyamalar sonucu elde edilen görüntüler (Tüm görüntüler 40x büyütme ile alınmıştır)



Şekil 3.13. Farklaştırılmış hücelere sırasıyla kontrol, 2.5 µM ve 5 µM olmak üzere 48 saat safranal uygulaması sonrası yapılan boyamalar sonucu elde edilen görüntüler (Tüm görüntüler 40x büyütme ile alınmıştır)

3.4. RNA İzolasyonu Sonuçları

Hücrelerden RNA izolasyonu 2.2.4’te anlatıldığı gibi uygulanmış sonrasında RNA’nın miktarı, kalite ve saflık tayinini yapabilmek adına spektrofotometrik ölçüm ve agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bu kapsamda örneklerin çalışma için uygun olarak izole edildiği anlaşılmıştır.

3.4.1. Spektrofotometrik analiz sonuçları

Spektrofotometrik analiz sonuçlarıyla izole edilen RNA’nın konsantrasyonu belirlenmiş olup bu veriler kullanılarak ve gerekli hesaplamalar yapılarak çalışmaların sonraki aşamaları için seyreltilmeleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca elde edilen A260/280 ve A260/230 oranlarıyla da RNA’nın başka bir nükleik asit ile kontamine olmadığı çalışmalarda kullanmak amacıyla yeterli saflığa sahip olduğuna karar verilmiştir. Aşağıda yer alan Çizelge 3.1’de spektrofotometrik analiz sonuçlarına yer verilmiştir.

Çizelge 3.1. RNA'nın µDrop analiz sonuçları

1.set 24h	Konsantrasyon	A260/ 280	A260/ 230	1.set 48h	Konsantrasyon	A260/ 280	A260/ 230
GM-1	319	1,92	0,286	GM-1	399	2,07	1,25
GM-2	277	2,02	0,874	GM-2	159	1,98	0,379
DM-1	314	1,97	0,98	DM-1	412	2,05	0,961
DM-2	380	2	1,53	DM-2	535	2,11	1,56
2.5 µM-1	28,2	1,63	0,0944	2.5 µM-1	496	2,09	1,41
2.5 µM-2	657	1,99	1,36	2.5 µM-2	582	2,07	1,01
2.5 µM-3	458	1,98	0,952	2.5 µM-3	544	2,09	1,33
5 µM-1	544	1,99	1,15	5 µM-1	316	2,02	0,856
5 µM-2	316	1,97	1,08	5 µM-2	389	2,05	1,09
5 µM-3	862	1,88	1,13	5 µM-3	454	2,06	1,3

Çizelge 3.2. (Devam)

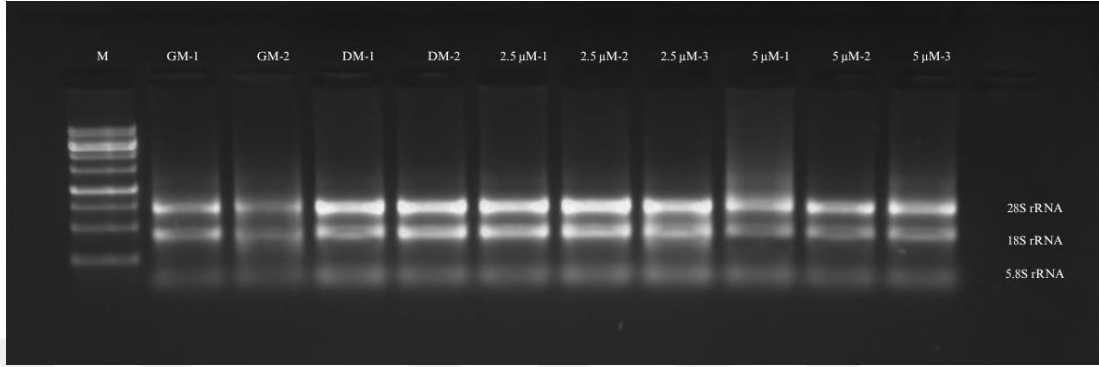
2.set 24h	Konsantrasyon	A260/ 280	A260/ 230	2.set 48h	Konsantrasyon	A260/ 280	A260/ 230
GM-1	501	1,94	1,64	GM-1	593	2,06	2,15
GM-2	464	1,95	1,38	GM-2	523	2,06	1,64
DM-1	780	2,01	1,72	DM-1	622	2,06	1,71
DM-2	750	1,95	1,88	DM-2	636	2,04	1,42
2.5 µM-1	730	1,96	1,72	2.5 µM-1	565	2,06	2,15
2.5 µM-2	714	1,97	1,88	2.5 µM-2	647	2,05	1,79
2.5 µM-3	802	1,96	1,76	2.5 µM-3	650	2,02	1,71
5 µM-1	689	1,99	1,31	5 µM-1	585	2,04	1,56
5 µM-2	748	1,97	1,9	5 µM-2	510	2,04	1,78
5 µM-3	677	1,94	1,4	5 µM-3	670	2,03	1,84

3.4.2. RNA Örneklerinin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi

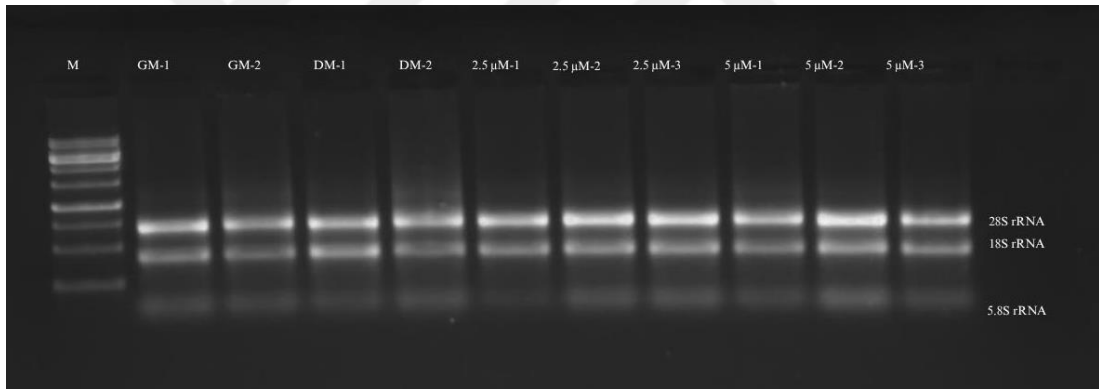
Agaroz jel ile spektrofotometrik ölçüm sonrası üç bant görüntüsünü gözlemlemek ve olmaması gereken bir yerde bant görüntüsü olup olmadığını tespit etmek amaçlanmıştır. Jel görüntüleri incelendiğinde spektrofotometrik ölçümler ile tutarlı olarak konsantrasyonu az olan 1.set 24 saat 2.5 µM-1 RNA örneğinde daha silik bir üç bant görüntüsü olduğu gözlemlenmiştir. Diğer RNA örnekleri belirgin üç bant görüntüsü gözlemlenmiştir. RNA örneklerinde rRNA' ya ait olan 5.8S, 18S ve 28S olmak üzere üç bant görüntüsü olduğu başka yerde başka bir bant görüntüsünün bulunmadığı anlaşılmıştır. Hem spektrofotometrik hem de agaroz sonuçları göz önüne

alınarak tüm setlerin her saatinde dozlardan birer örnek elenmesiyle böylelikle dört grup için 8 örnek olacak şekilde eşit deney koşulları oluşturulmuştur.

Bir set bir saat için örnek sayısı 10'dan 8'e düşürülmüştür. 2.sete ait agaroz jel görüntüleri 24 saat için Şekil 3.14 ve 48 saat için Şekil 3.15'te verilmiştir.



Şekil 3.14. 2.set 24 saate ait agaroz jel görüntüleri



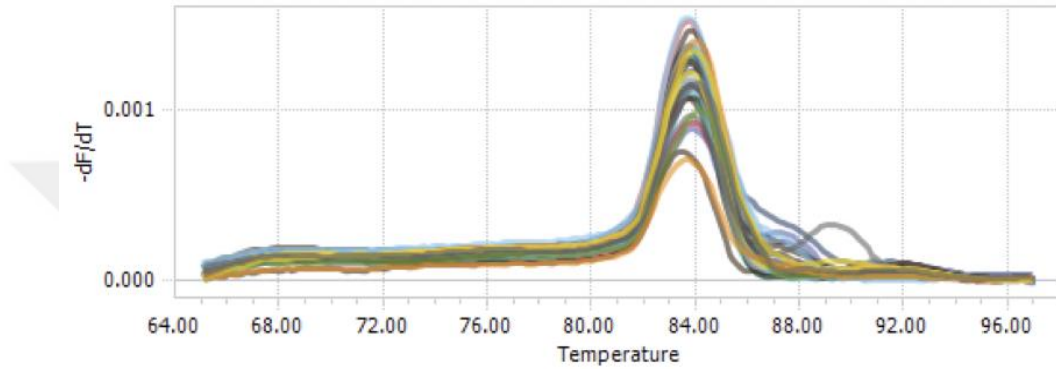
Şekil 3.15. 2.set 48 saate ait agaroz jel görüntüleri

3.5. Real Time Kantitatif PCR (qPCR) Sonuçları

Real time PCR deneyleri 2.2.7'de yer verilen cDNA sentez protokolüne göre sentezlenmiş olan cDNA'ların kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi, elde edilen RNA örneklerinin 100 ng/µL konsantrasyonda ve 50 µL hacme seyreltilmesi sonrasında gerçekleştirilmiştir. qPCR deneyleri 2.2.8'de bahsedilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile analiz edilmiştir. $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi 2.2.9'da detaylı bir şekilde anlatılmıştır. Housekeeping gen olarak 18S kullanılmıştır.

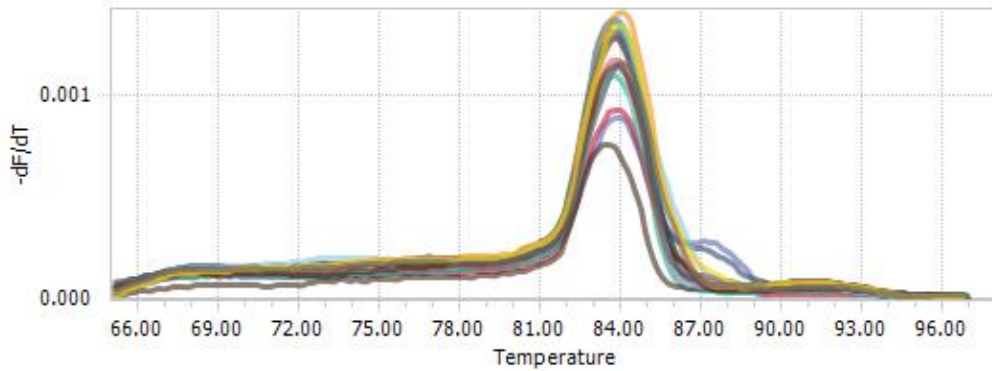
3.5.1. MtHSP70 geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

MtHSP70 primerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi sebebi ile gerçekleştirilen qPCR sonuçları incelendiğinde, erime sıcaklığı (T_m) eğrisi grafiğinde bütün örneklerin düzenli bir şekilde tek bir noktada pik verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 3.16.). Bu durum bize çalışmada herhangi bir kontaminasyon olmadığını göstermiştir. Bu nedenle elde edilen 24 ve 48 saat CT değerlerinin analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.16. MtHSP70 primerine ait erime sıcaklığı eğrisi

MtHSP70 primeri için yapılan qPCR deneyi sonucu, 24 saat örneklerinden elde edilen erime sıcaklığı eğrisi Şekil 3.17.'de verilmiştir.

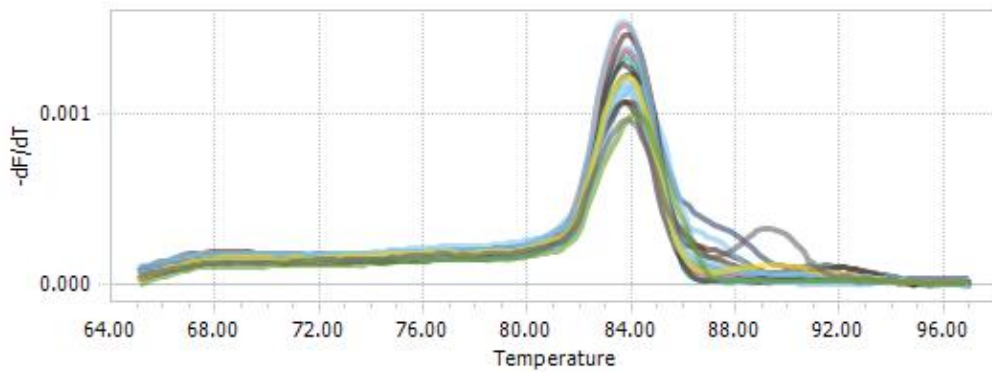


Şekil 3.17. Safran'al'e 24 saat maruz bırakılan hücrelere ait MtHSP70 geni erime sıcaklığı eğrisi

Safran'al'e 24 ve 48 saat maruz kalan hücrelere ait mtHSP70 verileri ayrı ayrı değerlendirildiğinde totalde elde edilen erime sıcaklığı eğrisine benzer bir sonuç olduğu görülmüştür. Bu doğrultuda elde edilen CT değerlerinin analiz edilmesinin uygun olacağına karar verilmiştir. Ek olarak qPCR sonuçların kullanılabilirliğini teyit

emek adına amplifikasyon grafikleri de incelenmiş ve örneklerin tamamının aynı sıcaklıkta reaksiyona girdiği ve fazları tamamladığı görülmüştür.

MtHSP70 primeri için yapılan qPCR deneyi sonucu, 48 saat örneklerinden elde edilen erime sıcaklığı eğrisi Şekil 3.18.'de verilmiştir.

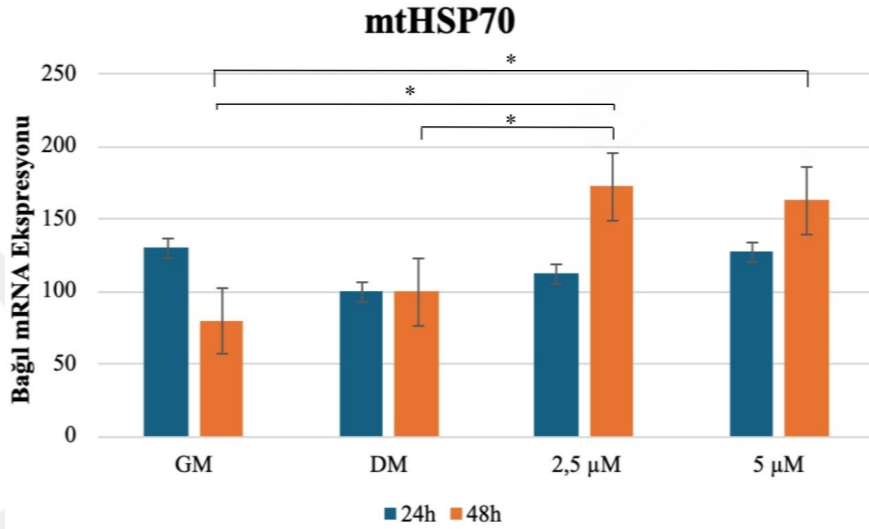


Şekil 3.18. Safran'al'e 48 saat maruz bırakılan hücrelere ait MtHSP70 geni erime sıcaklığı eğrisi
48 saat verileri de 24 saat verileri ile benzer şekilde tek bir yerde pik vermiştir. Amplifikasyon grafiği ve erime sıcaklığı eğrisi incelenmiş, sonuçların analiz için uygun olduğuna karar verilmiştir.

Safran'al'e 24 saat maruz bırakılan hücrelerde, mtHSP70 primeri kullanılarak uygulanan qPCR; safran'al'in mitokondri biyogenezi ile ilişkili olan mtHSP70 geninin ekspresyon seviyesi üzerine nasıl bir etkisi olduğunu tespit etmek sebebiyle gerçekleştirilmiştir.

qPCR sonucu elde edilen CT değerleri kullanılarak öncelikle ΔCT değeri sonrasında $\Delta\Delta CT$ değeri ve son olarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplanmıştır. Ve bu değerlere kendi aralarında ttest uygulanmış olup $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Böylelikle istatistiksel analiz sonucuna dayalı bir grafik oluşturulmuş olup (Şekil 3.19.), dozlara bağlı oluşturulan grupların mtHSP70 ekspresyon seviyeleri olgun adiposit yani farklılaşmış (DM) grubu hücrelerinden oluşan kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. Elde edilen grafiğe göre; 24 saatlik uygulama için dozlar DM grubu yani farklılaşmış olgun adiposit grubu ile kıyaslandığında, artış ve azalışlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

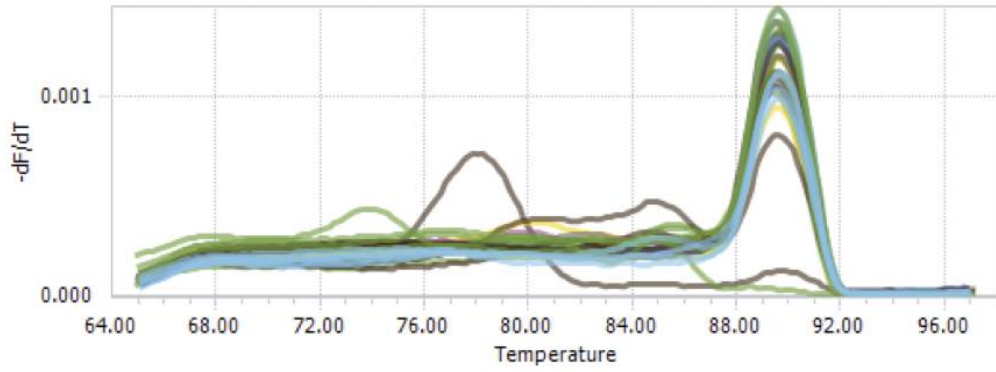
Elde edilen 48 saat grafiğine göre; dozlar DM grubu yani farklılaşmış olgun adiposit grubu ile kıyaslandığında 2.5 μ M grubunda mtHSP70 mRNA ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Aynı şekilde dozlar GM grubu ile karşılaştırıldığında 2.5 μ M ve 5 μ M gruplarında anlamlı artışlar görülmüştür. Hazırlanan sütun grafiğinde bulunan "*" sembolü, farklılaşmış hücre (DM) ve farklılaşmamış hücre (GM) ile diğer doz uygulaması yapılan gruplar kıyaslandığında elde edilen $p < 0,05$ değerini ifade etmektedir.



Şekil 3.19. MtHSP70 geni qPCR analiz sonuçları

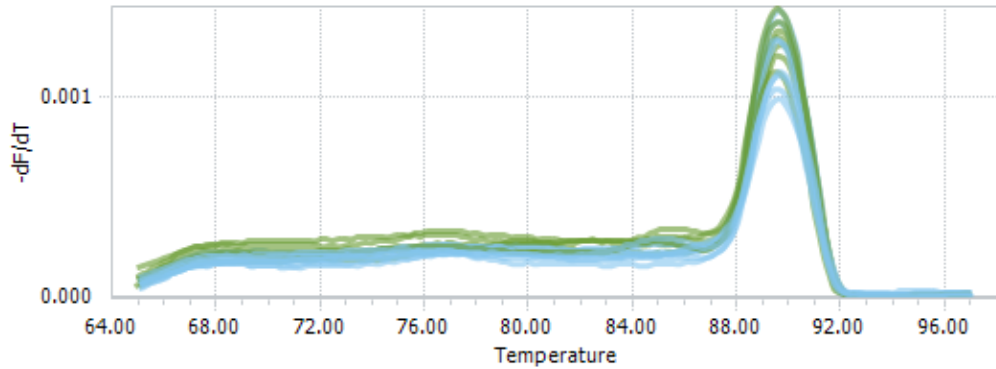
3.5.2. UCP-1 geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

UCP-1 primeri için yapılan qPCR uygulamaları sonucunda elde edilen erime sıcaklığı eğrisi grafiğinde iki örnek harici diğer tüm örneklerin aynı sıcaklıkta pik verdiği gözlemlenmiş ve başka bir yerde pik gözlenmemesi dikkate alınarak çalışma da kontaminasyona rastlanılmadığı neticesine varılmıştır. Düzgün pik vermeyen örnekler pozitif ve negatif kontrol kullanılarak tekrarlanmıştır. Bu nedenle elde edilen 24 ve 48 saat CT değerlerinin analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.20.).



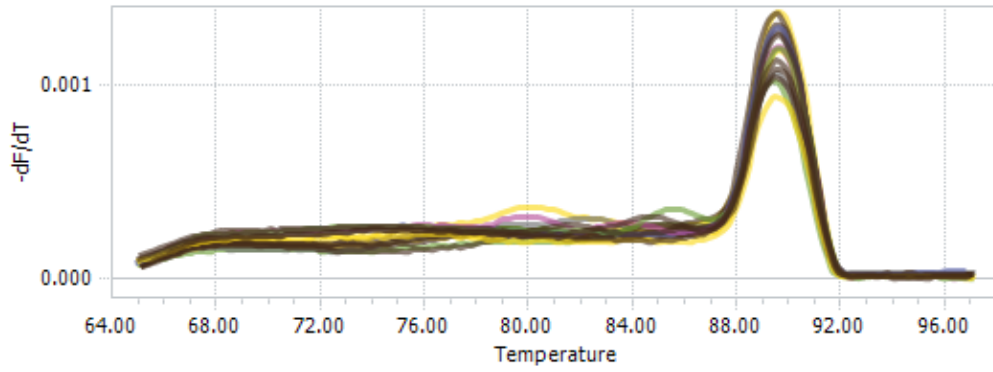
Şekil 3.20. UCP-1 primerine ait erime sıcaklığı eğrisi

UCP-1 primerinin, 24 saat süre safranal ile muamele edilen hücrelerde, mRNA ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimleri gözlemlemek adına qPCR uygulanmıştır. Uygulama sonucu elde edilen erime eğrisi grafiği incelendiğinde tüm örneklerin tek bir yerde ve düzgün bir pik verdiği saptanmıştır (Şekil 3.21.). Bu sebeple qPCR ile elde edilen CT değerlerinin analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.21. Safranal'e 24 saat maruz bırakılan hücelere ait UCP-1 geni erime sıcaklığı eğrisi

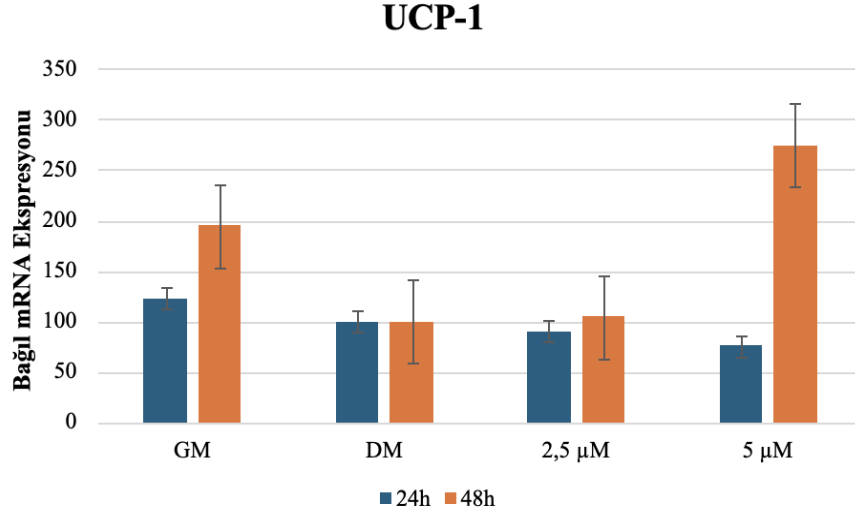
UCP-1 primerinin safranal'e 48 saat maruz kalan hücrelerde etkisini gözlemlemek adına yapılan qPCR uygulaması sonucu elde edilen piklerin tek bir yerde ve düzgün olduğu görülmüştür (Şekil 3.22.).



Şekil 3.22. Safran'le 48 saat maruz bırakılan hücrelere ait UCP-1 geni erime sıcaklığı eğrisi

Her iki saat uygulaması için de elde edilen erime sıcaklığı grafikleri ve amplifikasyon grafikleri incelenmiş, bu inceleme sonucunda qPCR sonucu oluşan verilerin analiz için kullanılabilir olduğuna karar verilmiştir. Bu durumun en önemli sebebi örneklerin tek bir yerde pik vermesi ve tüm fazları tamamlamalarıdır.

24 ve 48 saat boyunca safran'le maruz bırakılan hücrelerin RNA izolasyonundan sonra elde edilen cDNA'ları ile safran'ın adiposit kahverengileşmesi üzerine olan etkisini tespit etmek amacıyla UCP-1 primeri kullanılarak qPCR uygulaması yapılmıştır. qPCR sonrası ortaya konan veriler ile ttest yapılmış ve bu istatistiksel analize bağlı olarak bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 3.23). Dozlara bağlı oluşturulan grupların UCP-1 ekspresyon seviyeleri DM grubu hücrelerinden oluşan kontrol grubuna göre kıyaslanmıştır. Elde edilen grafiğe göre; hem 24 hem de 48 saatlik uygulama için dozlar DM grubu yani farklılaşmış olgun adiposit grubu ile kıyaslandığında, artış ve azalışlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak 48 saatlik uygulama sonrasında dozun artışına bağlı olarak UCP-1 ekspresyonunun artması yönünde bir eğilim olduğu anlaşılmıştır. Hazırlanan sütun grafiğinde bulunan "*" sembolü, farklılaşmış hücre (DM) ve farklılaşmamış hücre (GM) ile diğer doz uygulaması yapılan gruplar kıyaslandığında elde edilen $p < 0,05$ değerini ifade etmektedir.



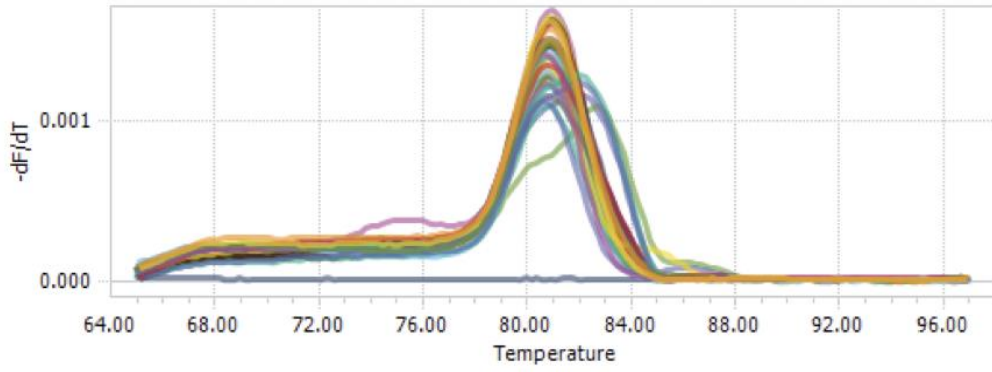
Şekil 3.23. UCP-1 geni qPCR analiz sonuçları

3.5.3. CEBP- α geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

24 ve 48 saatlik safranal uygulamaları sonrası CEBP- α geni mRNA ekspresyonu üzerinde etkisinin varlığını ya da yokluğunu tespit etmek adına qPCR deneyi yapılmıştır. qPCR sonucunda elde edilen verilerin analize uygun olmadığı anlaşılmıştır bunun nedeninin örneklerin birbirinden çok farklı yerlere ve düzensiz pikler oluşturmasıdır. Bu durumun uygun deney ortamının sağlanamaması veya primerlerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu nedenle CEBP- α primerinin deney planından çıkarılması, adipogenez ve kahverengileşme için kullanılan PGC-1 α geninin eklenmesi kararlaştırılmıştır.

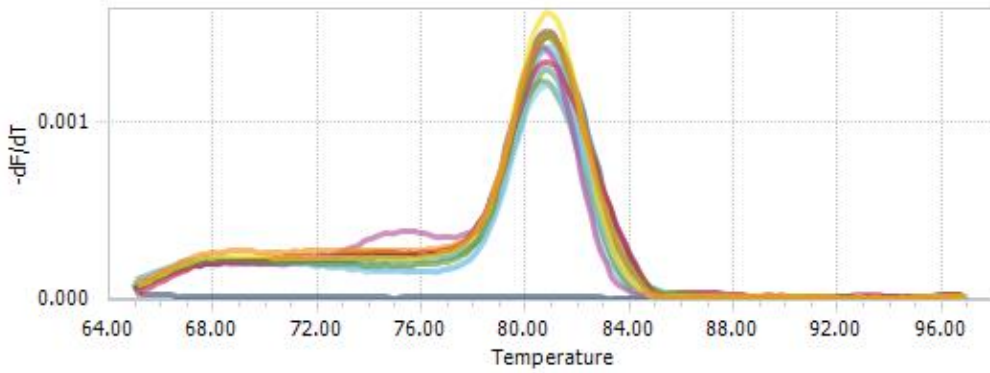
3.5.4. PGC-1 α geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

PGC-1 primeri için yapılan qPCR uygulamaları sonucunda elde edilen erime sıcaklığı eğrisi grafiğinde tüm örneklerin aynı sıcaklıkta pik verdiği ve bu durum çalışmanın başarıyla yapıldığını herhangi bir kontaminasyon olmadığını göstermiştir (Şekil 3.24). Böylelikle safranal'in PGC-1 α geninin mRNA ekspresyonu üzerinde azaltıcı veya artırıcı bir etkisinin olup olmadığını anlamaya yönelik olarak analiz gerçekleştirilebilecek sonuçlara ulaşılmıştır. Bu karar verilirken amplifikasyon grafikleri de göz önünde tutulmuştur.



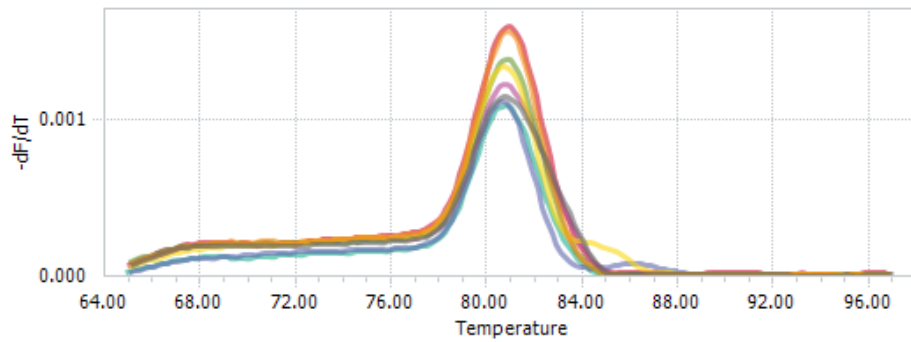
Şekil 3.24. PGC-1 α primerine ait erime sıcaklığı eğrisi

24 saatlik safranal uygulaması sonrası PGC-1 α geni için uygulanan qPCR deneyi sonucu elde edilen erime sıcaklığı eğrisi Şekil 3.25'te verilmiştir.



Şekil 3.25. Safranal'e 24 saat maruz bırakılan hücelere ait PGC-1 α geni erime sıcaklığı eğrisi

48 saatlik safranal uygulaması sonrası PGC-1 α geni için uygulanan qPCR deneyi sonucu elde edilen erime sıcaklığı eğrisi Şekil 3.26'te verilmiştir.

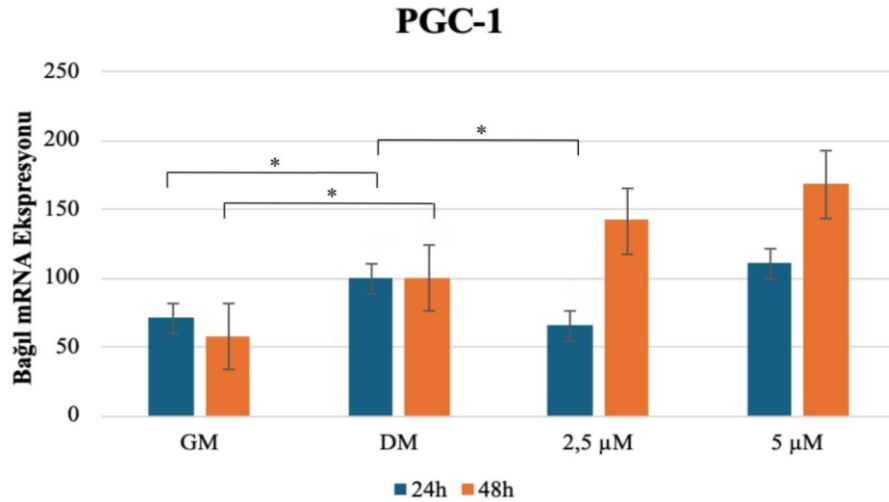


Şekil 3.26. Safranal'e 48 saat maruz bırakılan hücelere ait PGC-1 α geni erime sıcaklığı eğrisi

Elde edilen CT değerleri; ΔCT , $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ ye dönüştürülmüş sonrasında ttest uygulanarak anlamlılık değerleri hesaplanmış ve analiz tamamlanmıştır. Anlamlılık değerlendirilirken DM kontrol olarak alınmıştır.

Safranal'e 24 saat maruz kalan hücrelerde, gerçekleştirilen qPCR; safranal' in hücresel enerji metabolizmasının düzenlenmesinde ve adipogenezde rol oynayan aynı zamanda soğuğa maruz kalma durumunda termogenez ile yakından ilişkili olan PGC-1 α geninin ekspresyon seviyesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 24 ve 48 saat verilerine göre grafik oluşturulmuştur (Şekil 3.27).

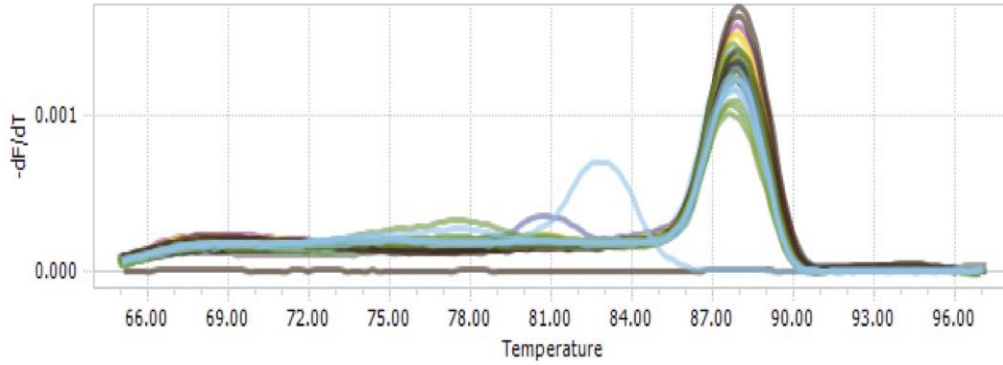
Grafik incelendiğinde 24 ve 48 saatlik uygulama sonrası GM grubuna kıyasla DM grubunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Bu durum PGC-1 α 'nın adipogenez ile ilgili bir marker olması ve yağ birikiminin artması ile karakterize olarak arttığı düşünülmüştür. Aynı şekilde 24 saatlik uygulama sonrası 2.5 μM doz uygulamasıyla beraber DM kontrol grubuna kıyasla PGC-1 α geni bağıl mRNA ekspresyon seviyelerinde bir azalma meydana gelmiştir. Hazırlanan sütun grafiğinde bulunan "*" sembolü, farklılaşmış hücre (DM) ve farklılaşmamış hücre (GM) ile diğer doz uygulaması yapılan gruplar kıyaslandığında elde edilen p <0,05 değerini ifade etmektedir.



Şekil 3.27. PGC-1 geni qPCR analiz sonuçları

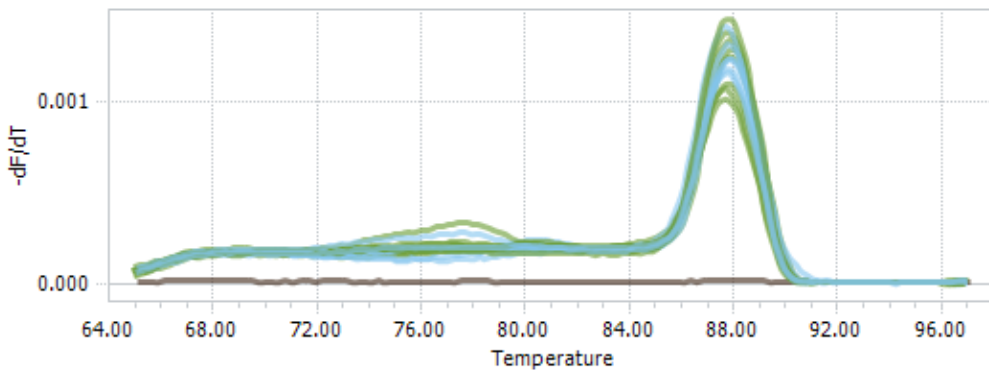
3.5.5. GLUT-4 geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Safranal'e 24 saat maruz kalan hücrelerde GLUT-4 mRNA seviyesini değerlendirmek amacı ile yapılan qPCR'da erime sıcaklığı eğrisinde yer alan piklerin bir örnek harici tek bir noktada düzenli olması sebebiyle istatistiksel analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlarda tüm örneklerin reaksiyona girdiği saptanmıştır (Şekil 3.28).



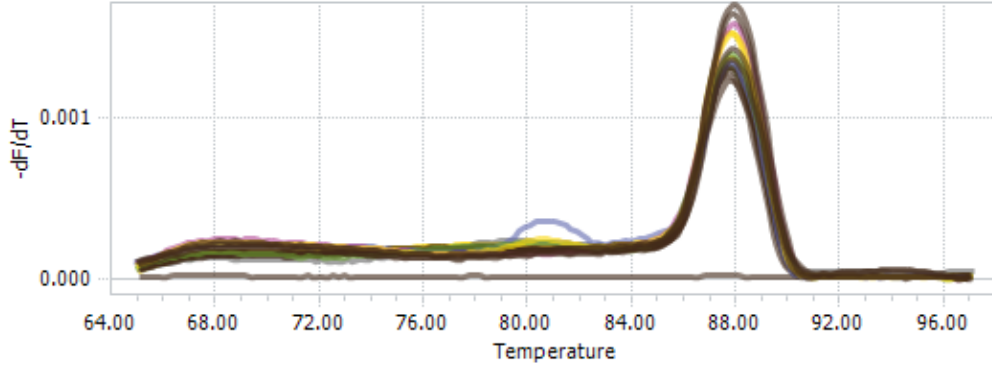
Şekil 3.28. GLUT-4 primerine ait erime sıcaklığı eğrisi

GLUT-4 geninin ekspresyon seviyeleri üzerinde; 24 saatlik safranal uygulamasının bir etkiye sebebiyet verip vermediğini tespit etmek amacıyla qPCR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen erime sıcaklığı grafiği Şekil 3.29'da verilmiştir.



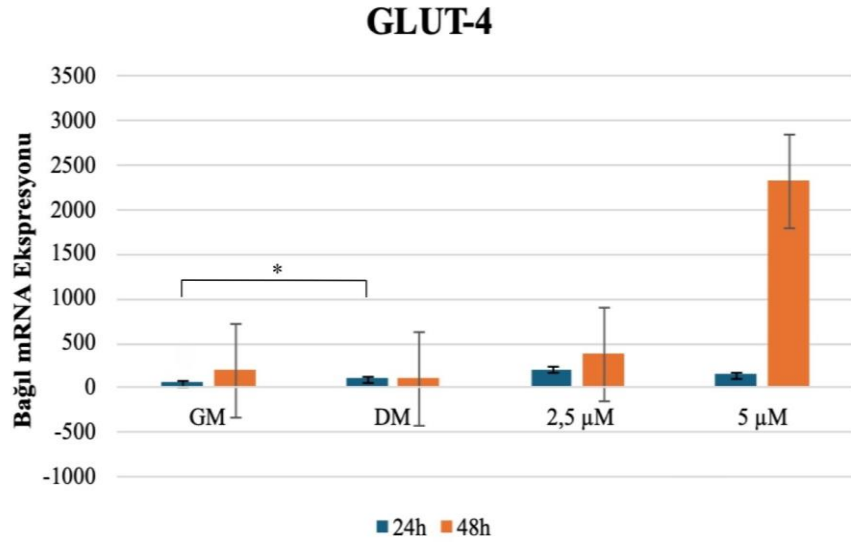
Şekil 3.29. Safranal'e 24 saat maruz bırakılan hücrelere ait GLUT-4 geni erime sıcaklığı eğrisi

48 saatlik safranal uygulanmasının ardından PGC-1 α geni için qPCR deneyi uygulanmıştır. qPCR sonucu elde edilen erime sıcaklığı eğrisi Şekil 3.30'da verilmiştir.



Şekil 3.30. Safranal'e 48 saat maruz bırakılan hücrelere ait GLUT-4 geni erime sıcaklığı eğrisi

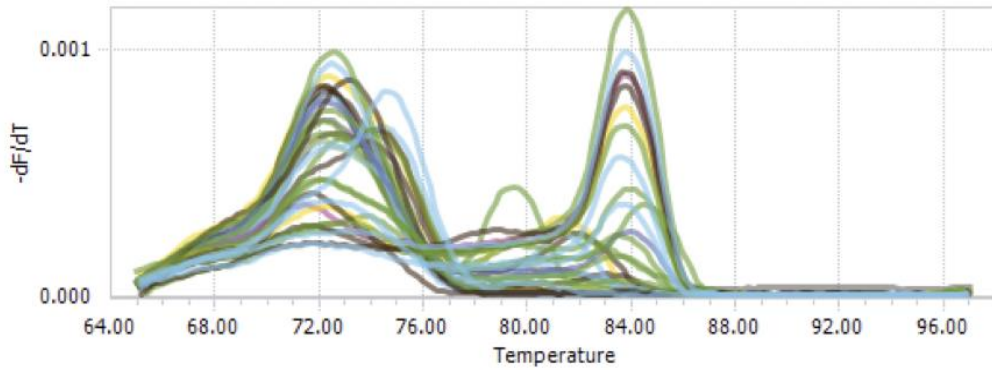
Safranal'e 24 saat maruz kalan hücrelerde, GLUT-4 primeri kullanılarak qPCR uygulaması yapılmıştır. qPCR uygulaması safranal' in insülin duyarlılığı, bu bağlamda vücutta bulunan şekerin hücre içerisine alınmasını sağlayarak kan şeker seviyesinin düzenlenmesi ile doğrudan bağlantılı olan GLUT-4 geninin ekspresyon seviyesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. qPCR sonucunda ortaya çıkan CT değerleri kullanılarak bir grafik oluşturulmuştur (Şekil 3.31.). 24 ve 48 saat verileri ile oluşturulan grafik incelendiğinde 24 saatlik uygulama için farklılaşmamış hücre (GM) kontrol grubu GLUT-4 mRNA ekspresyon seviyesi, farklılaşmış hücre (DM) kontrol grubu GLUT-4 mRNA'sına kıyasla daha az eksprese olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.31.). 48 saatlik uygulama için ise anlamlı bir sonuç elde edilememiş ancak dozun artışına bağlı olarak GLUT-4'ün de arttığı yönde bir eğilim olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum safranal' in insülin duyarlılığı artırıcı yönde bir etki oluşturabileceği yönünde bir izlenim oluşturmaktadır. Hazırlanan sütun grafiğinde bulunan "*" sembolü, farklılaşmış hücre (DM) ve farklılaşmamış hücre (GM) ile diğer doz uygulaması yapılan gruplar kıyaslandığında elde edilen $p < 0,05$ değerini ifade etmektedir.



Şekil 3.31. GLUT-4 geni qPCR analiz sonuçları

3.5.6. PPAR- γ geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Adiposit biyogenezinde ve enflamatuvar süreçlerin yönlendirilmesinde kritik olan PPAR- γ geni için qPCR deneyi kurulmuştur. 24 ve 48 saatlik safranal maruziyeti sonrası PPAR- γ geni mRNA ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Elde edilen erime eğrisi (Şekil 3.32.) ve amplifikasyon grafiği analiz için uygun bulunmamıştır. Elde edilen grafiklerde örnekler birbirinden ayrı yerlerde düzensiz pikler ve bağlanmalar göstermiştir. PPAR- γ geni alternatifi olarak ise mtHSP60 geninin değerlendirilmesi kararlaştırılmıştır.



Şekil 3.32. PPAR- γ primerine ait erime sıcaklığı eğrisi

3.5.7. mtHSP60 geni için qPCR sonuçlarının değerlendirilmesi

mtHSP60 geni için 24 ve 48 saatlik uygulama yapılan örneklerde qPCR deneyi kurulmuştur. Ancak elde edilen erime sıcaklığı eğrisi grafiğinde birden fazla alanda düzensiz pik olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu markerinde deney planından çıkarılmasına karar verilmiştir.



4. TARTIŞMA

İnsülin direnci genetik yatkınlıklara, çevre koşullarına veya yaşam tarzına bağlı olarak insülinin hücrel sinyal iletim yolağını harekete geçirme kapasitesinde meydana gelen azalma buna bağlı olarak glukozu substrat insülini ligand olarak kullanan hücrelerde meydana gelen işlev kaybı olarak tanımlanabilir. İnsülin direnci başta tip 2 diyabet olmak üzere çeşitli metabolik hastalıkların oluşumuna sebep olur. İnsülin duyarlılığı ise insülin direnciyle negatif korelasyon gösterir. İnsülin direncinin oluşumuna sebep olan mekanizmalar insülin duyarlılığında meydana gelen azalma ile sonuçlanır. Ortamda insülin bulunsa dahi cevap veren iskelet kası, karaciğer ve yağ doku gibi dokularda insülin aracılı sinyal iletiminde aksama meydana gelir bu yolak harekete geçmez bu nedenle kan şeker seviyesi yüksek kalır. İnsülin duyarlılığında meydana gelen azalma hücrel olarak; GLUT-4 aracılı insülin sinyal iletiminde meydana gelen bozulma, glikojen depo yeteneğinde meydana gelen azalma, lipid depolama kapasitesinde azalma, enflamatuvar süreçlerin gelişmesi ve mitokondriyal fonksiyonda gelişen işlev bozukluğu olarak görülebilir (Defronzo, 2009; Shulman, 2014). İnsülin duyarlılığını artırıcı tedaviler geliştirilmesi ve böylelikle tip 2 diyabet başta olmak üzere diğer metabolik hastalıkların engellenmesi kritiktir.

Tip 2 diyabet açlık veya yemek sonrası durumda hiperglisemi yani kan şeker seviyelerinin yüksek olması olarak tanımlanabilir. Bu durum yalnızca şeker seviyesinin yüksek kalmasına neden olmaz aynı zamanda nöropati, nefropati gibi komplikasyonların ve diğer metabolik rahatsızlıklarında gelişimine sebep olur. Tip 2 diyabette hiperglisemi durumunun gelişimi oldukça karmaşık ve kompleks bir süreçtir. Bu süreç en basit haliyle insülin duyarlılığında meydana gelen bozulmalar ve insülin duyarlılığında meydana gelen azalmayı telafi edemeyen beta hücreleri olarak tanımlanabilir (Kahn vd., 2014). Tip 2 diyabet prevalansı oldukça fazla olup dünya üzerinde 400 milyondan fazla insanı etkilemektedir (Zimmet vd., 2016). Bu durum tip 2 diyabeti engelleyici ve tedavi edici yeni stratejilerin oluşturulması için önem teşkil eder.

Adipoz dokusu ile ilgili yapılan çalışmalar adipoz dokunun sadece bir doku olmadığını aynı zamanda salgıladığı adipokinler nedeniyle endokrin organ gibi davrandığı ve inflamatuvar yanıtı düzenleyebildiği için bağışıklık sistemi gibi çalıştığı keşfedilmiştir.

Metabolizma, enerji homeostazı ve termogenezde önemli bir rol oynarlar. Ancak bu dokunun düzensizliği obezite ve insülin direnci başta olmak üzere birçok metabolik rahatsızlığın oluşumuna neden olur. Temelde 2 farklı yağ doku türü bulunur bunlar beyaz adipoz doku ve kahverengi adipoz dokudur. Bu iki doku kökenleri, hücresel yapıları, vücuttaki lokalizasyonları, işlevleri, depoladıkları lipidleri kullanma amaçları ve renkleri bakımından birbirinden ayrılır. Beyaz adipoz doku bir insan vücudunda en fazla bulunan yağ dokudur. Subkutan ve visseral olmak üzere vücutta dağılım gösterir. Özetle 2 temel işlevi bulunur; bunlardan biri vücutta alınan fazla yağın lipid depolarında trigliserit olarak depolanması ve ihtiyaç anında serbest yağ asitlerine çevrilerek dolaşıma salınmasıdır. Bir diğeri ise metabolik olarak birçok işlevi yerine getiren hormon ve sinyal molekülleri salgılamaktır. Bu dokunun düzensizliği adiposit hipertrofisi ve hiperplazisi ile ilgilidir. Bu düzensizlik başta proinflatuar sitokinlerin salgılanmasında dahası başka diğer sorunların gelişmesine sebep olur (Ottaviani vd., 2011; Coelho vd., 2013; Yiannikouris vd., 2010).

Kahverengi adipoz doku hücreleri fazla sayıda mitokondri içerir ve bu mitokondrilerinden UCP-1 ekspresyonu yoluyla ATP üretimi olmaksızın ısı üreterek termogenezi sağlar. Bu sebeple kahverengi adipoz doku beyaz adipoz doku depolarını etkiler ve enerji harcamasını yükselterek hiperlipidemiye azaltır. Kahverengi adipoz dokunun yağ oksidasyonu yağ yakma potansiyelleri vardır. Bu nedenle kahverengi adipoz dokunun aktivitesi teşvik edilerek kalori harcanmasının artırılması böylelikle obezite ile mücadele etme araştırmaların ana konusu olmuştur. Beyaz adipoz dokuda belirli uyaranlarla kahverengileşme ile ilgili çeşitli genlerin uyarılması ve kahverengi benzeri bir yapı kazanmaları kahverengileşme olarak adlandırılır. Bu dokuların kahverengileşmeleri yağ yakma kapasitesi olan daha fazla hücrenin olması anlamına gelir. Yukarı belirtilen ve daha birçok faydasının olması kahverengileşmenin teşvik edilmesini için potansiyel yolların geliştirilmesi çalışmalarını önemli kılmaktadır (Cinti, 2009; Jastroch vd., 2010; Yoneshiro vd., 2011)

Safranal safranın uçucu yağında en fazla oranda bulunan safranin karakteristik tadının oluşumuna katkı sağlayan bir ikincil metabolittir. Yapılan çalışmalar ile safranalin anti-enflamatuvar, antioksidan, anti hiperglisemik, antiepileptik vb., etkileri olduğu gösterilmiştir (Anaigoudari vd., 2023). Obezite ve obeziteye bağlı gelişen diyabet bir halk sağlığı sorunudur. Bu sorunu kontrol altında tutmak ise her yıl milyonlarca ilacın

retilmesi ve hastalara ulaştırılması ile mümkün olmaktadır. Bu nedenle özellikle diyabetin tedavisinde güvenliği, etkinliği, düşük maliyeti ve daha az yan etki oluşturması gibi durumlar nedeniyle tıbbi bitkiler önem kazanmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan birçok farmasötik ilaç, yapısal olarak geleneksel şıfalı bitkilerde bulunan doğal bileşiklerden türetilmektedir. Örneğin, kan şekerini düşüren bir ilaç olan metforminin geliştirilmesi, diyabet tedavisinde *Galega officinalis*'in kullanımına kadar takip edilebilir (Ota ve Ulrih, 2017). Doğal zler ve bitkilerden izole edilen bileşikler dahil olmak üzere çeşitli doğal ürünlerin kilo kaybına yardımcı olduğu ve yüksek yağlı bir diyetle indüklenen obeziteyi önlediği bildirilmiştir (Mashmoul vd., 2013)

Çalışmamıza obezite ve diyabette etkisi kanıtlanan safranın aroma vericisi olan safranal'in diyabeti mimik eden 3T3L-1 hücre hattı üzerinde insülin duyarlılığı ve adiposit kahverengileşmesi üzerine olan etkileri transkripsiyonel düzeyde incelenmiştir. Çalışmamızda ATCC firmasından temin edilmiş 3T3-L1 hücre hattı kullanılmıştır. İlk olarak safranalin hücre canlılığı üzerine etkisini ve toksik olmayan konsantrasyonlarını belirlemek adına MTT testi uygulanmıştır. Safranal 3T3-L1 hücrelerine; 2.5 μ M, 5 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarında, 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanmıştır. Uygulama sonrası elde edilen veriler 3.2.1 ve 3.2.2'de yer almaktadır. Veriler incelendiğinde 72 saatlik uygulama sonrası canlılıkta bir azalma grlmştir. Safranalden bağımsız olarak hücrelerin canlılığının, hücrelerin büyüme ve çoğalma bakımından oldukça aktif olmaları bu nedenle 72 saat boyunca aynı besiyerinde kalmaları sebebiyle gerçekleşebileceği sonucuna varılmıştır. Çalışmaların devamında bu nedenle 72 saat ve 10 μ M parametresi çıkartılmıştır. Yapılan bir çalışmada izole edilen adiposit türevli kök hücrelere 1.25, 5, 10, 20, 40 ve 80 μ M konsantrasyonlarda safranal uygulanmış. Elde edilen verilere göre 20 μ M'ye kadar safranalin sitotoksik etki göstermediği bildirilmiştir ki bu durum elde ettiğimiz MTT verileri ile tutarlıdır (Jafari vd., 2022).

Cimas ve vd. (2023) yaptığı bir çalışmada krosetinin 3T3-L1 hücre hattında lipolitik bir etki gösterip göstermediği araştırılmıştır. Bu araştırmada 3T3-L1 adipositlerinin farklılaştırılması krosetin uygulaması da dahil olmak üzere toplamda yedi gün sürmüş yedinci günün sonunda çalışmada ulaşılması hedeflenen sonuçlar kapsamında belirlenen yöntemler uygulanmıştır. Krosetin uygulaması ise farklılaşma başlatıldıktan sonra beşinci günde yapılmıştır. Beşinci günde yapılan bu uygulama nedeniyle

sonrasında herhangi bir olumsuz durumla karşılaşıldığı bildirilmemiştir. Çalışmamız kapsamında da hücrelerin büyüme ve çoğalma yeteneklerinin fazla olması aynı zamanda hücrelerin olgun adiposit morfolojisi sergilemesi, lipid damlacıklarının çokça görülmesi sebebiyle safranal uygulamasına altıncı günde başlanmış yedinci ve sekizinci günde RNA izolasyonu ve Oil Red O boyama gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda safranal bileşiğinin insülin duyarlılığı ve adiposit kahverengileşmesi üzerine etkilerini transkripsiyonel düzeyde incelemek amacıyla gerçekleştirilen qPCR deneylerinde UCP-1, mtHSP70, GLUT-4 ve PGC-1 α genleri incelenmiştir.

Safranin antioksidan özelliği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Safranin gösterdiği bu antioksidan özellikler diyabet hastalığı söz konusu olduğunda oksidatif stresin azaltılmasına katkı sağlayarak pankreatik beta hücrelerinden insülin salgılanmasını artırır böylelikle cevap veren dokuların insülin duyarlılığını artırır (Bergman ve Ader, 2005; Konstantopoulos vd., 2017). Yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyet ve düşük seviyelerde streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik farelerde safranalin anti-enflamatuvar etkisi araştırılmış. Elde edilen sonuçlarda safranalin de antienflamatuvar etkiler gösterdiği bunu da TNF- α ve IL- β gibi sitokinler üzerinden gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Bu çalışma bağlamında safranalin, oksidatif stresi ve inflamatuvar yanıtla ilişkili olan NF κ B sinyal iletim yolağının aktivasyonunda önemli olan TNF- α ve IL-1 β seviyelerini azalttığı düşünüldüğünde, NF κ B aktivasyonunu nispeten engelleyerek β -hücre hasarını azaltıcı bazı etkilerinin olabileceği böylelikle hem antienflamatuvar hem de insülin duyarlılığı artırıcı bir etki gösterdiği düşünülebilir (Hazman ve Ovalı, 2015). Enflamatuvar sitokinlerin artışı enflamatuvar yanıtla yakından ilişkili olan çeşitli yolların aktivitesine bu durumda insülin direncinin oluşmasına ve insülin duyarlılığının azalmasına neden olan başlıca süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. Bizim de temel araştırma konumuz olan safranalin insülin duyarlılığı ve insülin direnci üzerine etkisinin varlığını tespit etmek, diyabet açısından kullanılabilecek başka aktif bir maddenin varlığını da ortaya çıkarmak anlamına gelir ki bu durum halihazırda insülin sekresyonunun düzeltilmesi adına kullanılan birçok aktif maddeye ek olarak yeni ve potansiyeli yüksek olan bir bileşiğin literatüre kazandırılmasına fayda sağlar. Yapılan bir çalışmada safranalin, tirozin fosfataz 1B'nin inhibisyonu ve glukoz taşıyıcı-4 proteininin ekspresyon seviyelerinin artırılması yoluyla insülin duyarlılığına katkı sağladığı ve glukotoksisiteyi engellediği bildirilmiştir (Maeda vd., 2014). Çalışmamızda insüline bağlı sinyal iletiminde glukozun hücre içine alınmasında işlev gören böylelikle insülin duyarlılığı ile yakından ilişkili olan GLUT-4 geni ve

mitokondriyal biyogenezde önemli olan aynı zamanda protein katlanmalarında aktif olan, insülin duyarlılığı başta olmak üzere mitokondride yerine getirdiği görevi ile kahverengileşmede de rolü sorgulanan mtHSP70 geninin transkripsiyonel düzeyde analizi gerçekleştirilmiştir.

HSP70 enflamatuvar süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar aynı zamanda katlanmamış proteinlerin düzenlenmesini ve endoplazmik retikulum stresini kontrol eder. Endoplazmik retikulum stresinin düzenlenmesiyle özellikle pankreastaki beta hücrelerinde anlamsız ve yanlış katlanmış proteinlerin birikimi engellenir ve insülin sinyal iletimindeki aksaklık düzeltilir. HSP70 ayrıca NF- κ B yolağının modülatörünün inhibitörü gibi davranır I κ B'nin fosforilasyonu böylelikle NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu engelleyerek yolağın çalışmasını engeller. Sonuç olarak proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu aşağı yönde düzenler (Wang vd., 2017; Kim ve Yenari, 2013). Safranalin gösterdiği antioksidan ve böylelikle insülin duyarlılığını artırıcı etkinin NF- κ B yolağı ile göstermesi nedeniyle bu çalışma kapsamında incelenmesi mantıklıdır. Yapılan bir çalışmada HSP70'in, 3T3-L1 adipositlerinde kurkuminin anti-inflamatuvar yanıtının düzenlenmesindeki rolü değerlendirilmiştir. Bu çalışma kapsamında 3T3-L1 adipositleri olgun adipositlere farklılaştırılmış sonrasında hücelere daha öncesinde yapılan çalışmalar ile belirlenen konsantrasyonlarda kurkumin ve kontrolü olarak çözücüsü dimetilsülfoksit uygulanmış. Bu uygulamanın ardından hücelere inflamatuvar yanıtı tetiklemek adına 30 dakika 10 μ g/mL lipopolisakkarit uygulanmış ya da 24 saat HSP70 inhibitörü 1 μ M pifithrin- μ uygulanmıştır. Sonuç olarak kurkuminin doza bağlı olarak HSP70 seviyelerini yükselttiği ve aynı zamanda kurkumin uygulanan hücrelerde LPS tarafından indüklenen NF- κ B hedef genlerinin ekspresyonunu engellemiştir (Shin ve Ajuwon, 2023).

mtHSP70 geni için elde edilen veriler incelendiğinde 24 saatlik uygulama için dozlar DM grubu yani farklılaşmış olgun adiposit grubu ile kıyaslandığında, artış ve azalışlar istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak hücrelerin olgunlaşmasıyla beraber mtHSP70 seviyelerinin azaldığı ve doz uygulanmaya başlanmasıyla, doz artışıyla beraber ekspresyon seviyelerinin artma eğilimde olduğu görülmüştür. 48 saatlik uygulama gerçekleştirildiğinde; doz uygulanmış gruplar ile DM grubu yani farklılaşmış olgun adiposit grubu kıyaslandığında 2.5 μ M grubunda mtHSP70 mRNA ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Aynı şekilde dozlar DM grubu kontrol tutulmak şartı ile GM grubu ile karşılaştırıldığında 2.5 μ M ve 5 μ M gruplarında

anlamli artişlar görölmüştür. Bu durum safranalin mtHSP70 seviyeleri üzerinde artırıcı bir etkisi olduğu sonucunu bize verir. Bu artırıcı etki safranalin antienflamatuvar etkisinin olabileceğini ve bunu NF-κB yolu üzerinden gerçekleştirebileceğini bize gösterir. Bu durum safranalinin insülin duyarlılığını artırıcı bir etkisi olduğunu gösterir. Aynı zamanda endoplazmik retikulum stresinin azaltmasıyla beta hücre fonksiyonunu düzenleyici böylelikle insülin sinyal yolunu düzenleyici bir etkisi olduğu anlaşılmıştır.

GLUT-4 geni için elde edilen 24 ve 48 saat sonuçları incelendiğinde; 24 saatlik uygulama için farklılaşmamış hücre GLUT-4 mRNA ekspresyon seviyesi, farklılaşmış hücre kontrol grubu GLUT-4 mRNA'sına kıyasla daha az eksprese olduğu tespit edilmiştir. Yine 24 saat uyulama için GLUT-4 ekspresyonun kontrole kıyasla artma eğiliminde olduğu görölmüştür. 48 saatlik uygulama için ise anlamlı bir sonuç elde edilememiş ancak doz bağımlı olarak GLUT-4 ekspresyonun da arttığı yönde bir eğilim olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum safranal' in insülin duyarlılığı artırıcı bir etki oluşturabileceği yönünde bir izlenim oluşturmaktadır.

Adiposit kahverengileşmesinde, sadece kahverengi adipoz dokuda eksprese edilmesi ve kahverengileşme süreciyle beraber ekspresyon göstermesi sebebiyle UCP-1 geni belirteç olarak kullanılmaktadır. Safranalin kahverengileşmesi üzerine olan etkilerini inceleyen bunu da UCP-1 ekspresyonunun incelenmesi ile yapan herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda çeşitli aktif bileşenler veya metotlar uygulanarak 3T3-L1 adipositlerinin kahverengileştirilmesi denenmiştir. Adipoz dokunun kahverengileştirilmesi enerji harcanmasının artırabilmesi ve yağ oksidasyonu yapabilmesi sebebiyle önemlidir. Örneğin yapılan bir çalışmada corylin flavonoidinin obezite ile mücadelede etkisi araştırılmış. Bu durumu da 3T3-L1 adipositlerinde ve farelerde, adiposit kahverengileşmesi, mitokondriyal biyogenez ve UCP1 ekspresyonu incelenerek gerçekleştirilmiş. Bu çalışma sonucunda kısaca corylinin, kahverengi adipositlere özgü genlerin ekspresyonunu artırarak ve yağ asidi oksidasyonunu uyarak farelerde bej adiposit oluşumunu ve kahverengi adiposit aktivasyonunu stimüle ettiği aynı zamanda lipid birikimini engelleme ve vücut ağırlığının azalmasında katkı sağladığı gösterilmiştir (Chen vd., 2021). Çalışmamızda UCP-1 geni için 2.5 µM ve 5 µM konsantrasyonlarda safranal 24 ve 48 saat olarak 3T3-L1 adipositlere uygulanmış olup hem 24 hem de 48 saatlik uygulama için elde edilen veriler istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ancak 48 saatlik uygulama sonrasında doz bağımlı bağı olarak UCP-1 ekspresyonunun artmaya eğilimli olduğu

görülmüştür. Bu sonuç safranalin 48 saat uygulama ile safranalin kahverengileşmeye katkı sağlayabileceği yönde bir izlenim oluşturmaktadır. Fakat daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Peroksizom proliferatör-aktifleşmiş reseptör (PPAR), adiposit diferansiyasyonu ve enerji metabolizması fonksiyonlarını düzenler. PPAR koaktivatörü 1 (PGC-1), iskelet kası ve yağ dokusu dahil olmak üzere birçok dokuda mitokondriyal biyogenezin düzenlenmesinde görev alır. Ancak PGC-1 ilk olarak kahverengi adipoz dokuda soğuğa duyarlı bir protein olarak keşfedilmiştir. (Puigserver ve Spiegelman, 2003). PGC-1'in beyaz adipositlerde ekspresyonu gerçekleştiğinde, mitokondri yoğunluğunun artırılması yoluyla kahverengi adipositlere özgü genlerin ekspresyonu uyarılır (Tiraby vd., 2003). Bunun tersine bu genin nakavt edilmesi veya silinmesi termogenezde, mitokondriyal biyogenezde rol oynayan genlerin ekspresyonunun düşmesine böylelikle insülin direncinin gelişmesine sebep olur (Kleiner vd., 2012). Yapılan bir çalışmada *Osmanthus fragrans* bitkisinin adiposit farklılaşması ve adipogenez üzerine olan etkisi 3T3-L1 adipositlerinde transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde inceleniyor. Bu çalışmada bitkinin flavonoid ekstraktının reaktif oksijen türlerini azalttığı, kahverengi adipoz dokuya has belirteç genlerden *Pgc-1 α* 'nın mRNA ve protein seviyelerinin yükselmesi ve *UCP1*, *Cox7A1* ve *Cox8B* genlerinin ekspresyonunun artırılması yoluyla kahverengileşme yönünde bir etki gösterdiği belirleniyor (Yang vd., 2024). Çalışmamızda bu çalışmaya benzer olarak bir bitkinin sekonder metabolitinin 3T3-L1 adipositlere uygulanması gerçekleştirilmiş olup sonrasında PGC-1 α 'nın transkripsiyonel düzeyde analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde 24 ve 48 saatlik uygulama sonrası GM grubuna kıyasla DM grubunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Aynı şekilde 24 saatlik uygulama sonrası 2.5 μ M doz uygulamasıyla beraber DM kontrol grubuna kıyasla PGC-1 α geni bağlı mRNA ekspresyon seviyelerinde bir azalma meydana gelmiştir. Yine 24 saatlik uygulama için 5 μ M konsantrasyonda safranal uygulaması sonrası PGC-1 α artış göstermiştir. 48 saatlik uygulama sonrası bağlı PGC-1 α mRNA ekspresyonu seviyeleri istikrarlı olarak artış göstermiştir. Bu nedenle safranal için doz bağımlı olarak 48 saat uygulamanın daha etkili olabileceğini söyleyebiliriz.

5. SONUÇ

İnsülin duyarlılığı ve adiposit kahverengileşmesi; diyabet ve obezite ile mücadelede artırılması hedeflenen moleküler mekanizmalardır. Bu süreçlerin birbiriyle olan ilişkisi oldukça yakındır. Özellikle insülin duyarlılığında meydana gelen bozulma başta tip 2 diyabet olmak üzere diğer birçok metabolik rahatsızlığında gelişimine neden olur. Adiposit kahverengileşmesi ise dünya genelinde milyonlarca insanı etkileyen obezite ile mücadelede yağ yakma potansiyelleri nedeniyle önem kazanmıştır. Genetik sebepler ile diyabet gelişimi mümkün olabileceği gibi diğer birçok çevresel etmende bu durumu tetikleyebilir. Örneğin kötü tarza beslenme ve hareketsiz yaşam stilinin uzun bir süre devam ettirilmesi. Bu olay başta kilo alımı ile sonuçlanacağı gibi sonrasında insülin duyarlılığında meydana gelen azalma, diyabet, diyabete bağlı gelişen komplikasyonlar ve ateroskleroz gibi diğer hastalıkların gelişimine eşlik eder. Farmakolojik olarak insülin duyarlılığını indükleyebilecek ilaçlar geliştirilmiştir ancak yan etkilerinin daha az olması aynı zamanda düşük maliyetli olmaları nedeniyle bitkisel ürünler ve bileşenlerin kullanımı önem kazanmıştır. Aynı şekilde adiposit kahverengileşmesi henüz yeni çalışılan bir konu olması sebebiyle bu durumu teşvik edebilecek materyallerin ortaya çıkarılması bakımından bu bileşiklerin ve bitki materyallerinin çalışılması önemlidir.

Çalışmamızda, obezite diyabet çalışmalarında sıklıkla kullanılan 3T3-L1 preadiposit hücre hattı kullanılmıştır. Bu preadiposit hücre hattı çeşitli kimyasallar ile olgun adipositlere farklılaştırılmıştır. Hücrelerin olgun adiposit morfolojileri sergilemesi sonrası hücrelere 2.5 ve 5 μ M konsantrasyonlarda, 24 ve 48 saat zaman parametrelerinde safranal uygulaması gerçekleştirilmiştir. Uygulanacak doz ve zaman aralıkları MTT testi ile belirlenmiştir. Uygulamanın ardından hücrelerden RNA izolasyonu yapılmış elde edilen RNA'lar aynı konsantrasyon ve hacimde olacak şekilde seyreltilmiştir. Seyreltilmiş olan RNA'lar cDNA'ya çevrilmiş ve böylelikle hedef genlerin transkripsiyonel düzeyde analizi için gerekli olacak materyal elde edilmiştir. Bu çalışma kapsamında qPCR ile analizi gerçekleştirilen ve değerlendirilen genler UCP-1, mtHSP70, GLUT-4 ve PGC-1a'dır. Ek olarak doz uygulanan ve uygulanmayan hücrelere Oil Red O boyama uygulanmış olup deney modelinin gösterilmesi aynı zamanda bileşiğin lipid birikimi üzerine olan etkilerini gözlemlemek adına veri oluşturulmuştur. Adiposit kahverengileşmesi ve insülin duyarlılığının

transkripsiyonel düzeyde analizi bu mekanizmalarda aktif olan genlerin qPCR yöntemi kullanılarak değerlendirilmesiyle mümkün olmuştur. 24 ve 48 saat verileri incelendiğinde mtHSP70 seviyelerinin doz uygulamasıyla beraber doza bağlı olarak artma eğiliminde olduğu bunun 24 saat verileri için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen yine de hücrelerin olgunlaşmasıyla beraber mtHSP70 ekspresyon seviyelerinin düştüğü ve doz uygulanmaya başlanmasıyla beraber ekspresyon seviyelerinin artma eğiliminde olduğu görülmüştür. 48 saat verileri için hem 2.5 μ M hem de 5 μ M konsantrasyonlarda safranal uygulamasının mtHSP70 mRNA ekspresyon seviyelerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Safranal bu nedenle özellikle NF- κ B yolu üzerinden enflamatuvar yanıtı düzenleyerek insülin duyarlılığını artırıcı yönde etki gösterir. Aynı zamanda safranalin mtHSP70 mRNA ekspresyon seviyelerini artırması yoluyla endoplazmik retikulum stresinin azaltmasına böylelikle beta hücre fonksiyonunun düzenlenmesine ve insülin sinyal yolunun düzenlenmesine olumlu yönde etki gösterdiği anlaşılmıştır. GLUT-4 geni için preadiposit hücrelerin farklılaşmış hücrelere kıyasla daha az eksprese olması dışında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Ancak elde edilen verilere göre hem 24 hem de 48 saat safranal uygulamasıyla beraber doza bağımlı olarak GLUT-4 ekspresyonunun artma eğiliminde olduğu görülmüştür. UCP-1 geni için istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir sonuç elde edilememiştir ancak 48 saat safranal uygulamasının UCP-1 ekspresyonu üzerinde dozun artışına bağlı olarak artırıcı bir etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum safranalin kahverengileşmeyi artırıcı bir ajan olabileceğini gösterir. Bu olayı 48 saat PGC-1 α verileri de destekler. PGC-1 α geni 48 saat safranal uygulamasıyla beraber artma eğilimindedir ek olarak hem 24 hem de 48 uygulama sonrası farklılaşmamış hücreler kıyasla farklılaşmış hücrelerde de PGC-1 α seviyeleri artış göstermiş, 24 saat 2.5 μ M doz uygulaması ile de farklılaşmış kontrole kıyasla azalma meydana gelmiştir. Safranal bileşiğinin insülin duyarlılığı ve adiposit kahverengileşmesi üzerine olan artırıcı ve teşvik edici etkileri gösterilmiş olsa da tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Safranalin gösterdiği bu etkinin moleküler anlamda nasıl olarak gerçekleştiğini anlamak ve yorumlamak için farklı genler ve metotların kullanıldığı daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Alayunt, Ö. N., Aksoy, L., Karafakioğlu, Y. S., & Sevimli, S. (2019). Assessment of Anti-inflammatory and Antioxidant Properties of Safranal on CCl₄-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(2), e20181235. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920181235>
- Alemi, H., Khaloo, P., Rabizadeh, S., Mansournia, M. A., Mirmiranpour, H., Salehi, S. S., Esteghamati, A., & Nakhjavani, M. (2019). Association of extracellular heat shock protein 70 and insulin resistance in type 2 diabetes; independent of obesity and C-reactive protein. *Cell stress & chaperones*, 24(1), 69–75. <https://doi.org/10.1007/s12192-018-0942-x>
- Alfadhli E. M. (2015). Gestational diabetes mellitus. *Saudi medical journal*, 36(4), 399–406. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.4.10307>
- American Diabetes Association (2015). (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care*, 38 Suppl, S8–S16. <https://doi.org/10.2337/dc15-S005>
- Anaeigoudari, F., Anaeigoudari, A., & Kheirkhah-Vakilabad, A. (2023). A review of therapeutic impacts of saffron (*Crocus sativus* L.) and its constituents. *Physiological reports*, 11(15), e15785. <https://doi.org/10.14814/phy2.15785>
- Asano, T., Fujishiro, M., Kushiya, A., Nakatsu, Y., Yoneda, M., Kamata, H., & Sakoda, H. (2007). Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation on insulin action and its alteration in diabetic conditions. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 30(9), 1610–1616. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.1610>
- Bakshi, R. A., Sodhi, N. S., Wani, I. A., Khan, Z. S., Dhillon, B., & Gani, A. (2022). Bioactive constituents of saffron plant: Extraction, encapsulation and their food and pharmaceutical applications. *Applied Food Research*, 2(1), 100076. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100076>
- Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J. P., De Matteis, R., & Cinti, S. (2010). The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *American*

journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 298(6), E1244–E1253.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00600.2009>

Bargut, T. C. L., Souza-Mello, V., Aguila, M. B., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2017). Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 31(1), 10.1515/hmbci-2016-0051. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2016-0051>

Baskaran, P., Krishnan, V., Ren, J., & Thyagarajan, B. (2016). Capsaicin induces browning of white adipose tissue and counters obesity by activating TRPV1 channel-dependent mechanisms. *British journal of pharmacology*, 173(15), 2369–2389. <https://doi.org/10.1111/bph.13514>

Berger, J., & Moller, D. E. (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annual review of medicine*, 53, 409–435. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.104018>

Bergman, R. N., & Ader, M. (2005). Atypical antipsychotics and glucose homeostasis. *The Journal of clinical psychiatry*, 66(4), 504–514. <https://doi.org/10.4088/jcp.v66n0414>

Berry, R., & Rodeheffer, M. S. (2013). Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nature cell biology*, 15(3), 302–308. <https://doi.org/10.1038/ncb2696>

Bie, A. S., Cömert, C., Körner, R., Corydon, T. J., Palmfeldt, J., Hipp, M. S., Hartl, F. U., & Bross, P. (2020). An inventory of interactors of the human HSP60/HSP10 chaperonin in the mitochondrial matrix space. *Cell stress & chaperones*, 25(3), 407–416. <https://doi.org/10.1007/s12192-020-01080-6>

Blomberg, J., Andersson, M., Faldt, R., 1987. Differential pattern of oncogene and beta-actin expression in leukemic cells from AML patients. *Br. J. Haematology*, 65 (1), 83–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1987.tb06139.x>.

Blüher M. (2014). Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Molecular metabolism*, 3(3), 230–240. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2014.01.005>

- Brudzynski K. (1993). Insulinitis-caused redistribution of heat-shock protein HSP60 inside beta-cells correlates with induction of HSP60 autoantibodies. *Diabetes*, 42(6), 908–913. <https://doi.org/10.2337/diab.42.6.908>
- Bruun, J. M., Lihn, A. S., Pedersen, S. B., & Richelsen, B. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(4), 2282–2289. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1696>
- Cabré, A., Lázaro, I., Girona, J., Manzanares, J., Marimón, F., Plana, N., Heras, M., & Masana, L. (2007). Retinol-binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Journal of internal medicine*, 262(4), 496–503. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01849.x>
- Cannon B, Hedin A, Nedergaard J. 1982. Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue. *FEBS Lett* 150: 129 – 132.
- Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359.
- Cardone, L., Castronuovo, D., Perniola, M., Cicco, N., & Candido, V. (2019). Evaluation of corm origin and climatic conditions on saffron (*Crocus sativus* L.) yield and quality. *Journal of the science of food and agriculture*, 99(13), 5858–5869. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9860>
- Carmona, M., Zalacain, A., & Alonso, G. L. (2006). *The chemical composition of saffron: Color, taste and aroma* (1st ed.). Albacete, Spain: Bomarzo S.L.
- Carter, B. W., & Schucany, W. G. (2008). Brown adipose tissue in a newborn. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 21(3), 328–330. <https://doi.org/10.1080/08998280.2008.11928419>
- Chen, C. C., Kuo, C. H., Leu, Y. L., & Wang, S. H. (2021). Corylin reduces obesity and insulin resistance and promotes adipose tissue browning through SIRT-1 and β 3-AR activation. *Pharmacological research*, 164, 105291. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105291>

- Chouchani, E. T., Kazak, L., & Spiegelman, B. M. (2019). New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell metabolism*, 29(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.002>
- Christensen, A. A., & Gannon, M. (2019). The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Current diabetes reports*, 19(9), 81. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1196-4>
- Chung, J., Nguyen, A. K., Henstridge, D. C., Holmes, A. G., Chan, M. H., Mesa, J. L., Lancaster, G. I., Southgate, R. J., Bruce, C. R., Duffy, S. J., Horvath, I., Mestrl, R., Watt, M. J., Hooper, P. L., Kingwell, B. A., Vigh, L., Hevener, A., & Febbraio, M. A. (2008). HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1739–1744. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705799105>
- Cimas, F. J., De la Cruz-Morcillo, M. Á., Cifuentes, C., Moratalla-López, N., Alonso, G. L., Nava, E., & Llorens, S. (2023). Effect of Crocetin on Basal Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(6), 1254. <https://doi.org/10.3390/antiox12061254>
- Cinti S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 297(5), E977–E986. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00183.2009>
- Cinti S. (2012). The adipose organ at a glance. *Disease models & mechanisms*, 5(5), 588–594. <https://doi.org/10.1242/dmm.009662>
- Coelho, M., Oliveira, T., & Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of medical science: AMS*, 9(2), 191–200. <https://doi.org/10.5114/aoms.2013.33181>
- da Conceição Braga, L., Gonçalves, B. Ô. P., Coelho, P. L., da Silva Filho, A. L., & Silva, L. M. (2022). Identification of best housekeeping genes for the normalization of RT-qPCR in human cell lines. *Acta histochemica*, 124(1), 151821. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151821>
- Das U. N. (1999). GLUT-4, tumor necrosis factor, essential fatty acids and daf-genes and their role in insulin resistance and non-insulin dependent diabetes

mellitus. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 60(1), 13–20.
<https://doi.org/10.1054/plef.1998.0003>

Dasu, M. R., Devaraj, S., Park, S., & Jialal, I. (2010). Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes care*, 33(4), 861–868. <https://doi.org/10.2337/dc09-1799>

DeFronzo R. A. (2009). Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 58(4), 773–795. <https://doi.org/10.2337/db09-9028>

del Campo, C. P., Carmona, M., Maggi, L., Kanakis, C. D., Anastasaki, E. G., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., & Alonso, G. L. (2010). Picrocrocin content and quality categories in different (345) worldwide samples of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), 1305–1312. <https://doi.org/10.1021/jf903336t>

Demir, S., Nawroth, P. P., Herzig, S., & Ekim Üstünel, B. (2021). Emerging Targets in Type 2 Diabetes and Diabetic Complications. *Advanced science* (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 8(18), e2100275. <https://doi.org/10.1002/advs.202100275>

Driskell RR, Jahoda CA, Chuong CM, Watt FM, Horsley V. Defining dermal adipose tissue. *Exp Dermatol*. 2014; 23:629–631. [PubMed: 24841073]

Erben-Russ, M., Michel, C., Bors, W., & Saran, M. (1987). The reaction of sulfite radical anion with nucleic acid components. *Free radical research communications*, 2(4-6), 285–288. <https://doi.org/10.3109/10715768709065293>

Farahmand, S. K., Samini, F., Samini, M., & Samarghandian, S. (2013). Safranal ameliorates antioxidant enzymes and suppresses lipid peroxidation and nitric oxide formation in aged male rat liver. *Biogerontology*, 14(1), 63–71. <https://doi.org/10.1007/s10522-012-9409-0>

Farshid, A. A., & Tamaddonfard, E. (2015). Histopathological and behavioral evaluations of the effects of crocin, safranal and insulin on diabetic peripheral neuropathy in rats. *Avicenna journal of phytomedicine*, 5(5), 469–478.

- Fasshauer, M., & Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends in pharmacological sciences*, 36(7), 461–470. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.014>
- Fenzl, A., & Kiefer, F. W. (2014). Brown adipose tissue and thermogenesis. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 19(1), 25–37. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2014-0022>
- Fu, Z., Gilbert, E. R., & Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Current diabetes reviews*, 9(1), 25–53.
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Ghorbani, R., & Koocheki, A. (2017). Sustainable cultivation of saffron in Iran. In E. Lichtfouse (Ed.). *Sustainable Agriculture Reviews* (pp. 169–203). Springer.
- Gupta, R. K., Mepani, R. J., Kleiner, S., Lo, J. C., Khandekar, M. J., Cohen, P., Frontini, A., Bhowmick, D. C., Ye, L., Cinti, S., & Spiegelman, B. M. (2012). Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell metabolism*, 15(2), 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.010>
- Haeusler, R. A., McGraw, T. E., & Accili, D. (2018). Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(1), 31–44. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.89>
- Halvorson, Sarah. (2008). Saffron Cultivation and Culture in Central Spain. *Focus on Geography*. 51. 17-24. 10.1111/j.1949-8535.2008.tb00215.x.
- Hatziagapiou, K., Kakouri, E., Lambrou, G. I., Bethanis, K., & Tarantilis, P. A. (2019). Antioxidant Properties of *Crocus Sativus* L. and Its Constituents and Relevance to Neurodegenerative Diseases; Focus on Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Current neuropharmacology*, 17(4), 377–402. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180321095705>

- Hazman, Ö., & Ovalı, S. (2015). Investigation of the anti-inflammatory effects of safranal on high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Inflammation*, 38(3), 1012–1019. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-0065-1>
- Heaney, Stephanie & Koidis, Tassos & Morin, Jean-François. (2018). *FOODINTEGRITY HANDBOOK A GUIDE TO FOOD AUTHENTICITY ISSUES AND ANALYTICAL SOLUTIONS* Chapter18: Tea & flavoured tea.
- Himeno, H. & Sano, K. (1987). Synthesis of Crocin, Pjcrocrocin and Safranal by Saffron Stigma-like Structures Proliferated in Vitro. *Agricultural and Biological Chemistry*. Volume 51 Issue 9 Pages 2395-2400. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.51.2395>
- Hofstetter, J., Arfken, A., Kahler, A., Qvarnstrom, Y., Rodrigues, C., & Mattioli, M. (2024). Evaluation of coccidia DNA in irrigation pond water and wastewater sludge associated with *Cyclospora cayetanensis* 18S rRNA gene qPCR detections. *Microbiology spectrum*, 12(8), e0090624. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00906-24>
- Hondares, E., Iglesias, R., Giralt, A., Gonzalez, F. J., Giralt, M., Mampel, T., & Villarroya, F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *The Journal of biological chemistry*, 286(15), 12983–12990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.215889>
- Hosseinzadeh, H., & Noraei, N. B. (2009). Anxiolytic and hypnotic effect of *Crocus sativus* aqueous extract and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Phytotherapy research* : PTR, 23(6), 768–774. <https://doi.org/10.1002/ptr.2597>
- Hotamisligil G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature05485>
- Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C. G., & Willett, W. C. (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *The New England journal of medicine*, 345(11), 790–797. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010492>

- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x>
- Jafari, F., Emami, S. A., Javadi, B., Salmasi, Z., Tayarani-Najjaran, M., & Tayarani-Najjaran, Z. (2022). Inhibitory effect of saffron, crocin, crocetin, and safranal against adipocyte differentiation in human adipose-derived stem cells. *Journal of ethnopharmacology*, 294, 115340. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115340>
- Jastroch, M., Divakaruni, A. S., Mookerjee, S., Treberg, J. R., & Brand, M. D. (2010). Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in biochemistry*, 47, 53–67. <https://doi.org/10.1042/bse0470053>
- Jentjens, R., & Jeukendrup, A. (2003). Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 33(2), 117–144. <https://doi.org/10.2165/00007256-200333020-00004>
- José Bagur, M., Alonso Salinas, G. L., Jiménez-Monreal, A. M., Chaouqi, S., Llorens, S., Martínez-Tomé, M., & Alonso, G. L. (2017). Saffron: An Old Medicinal Plant and a Potential Novel Functional Food. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(1), 30. <https://doi.org/10.3390/molecules23010030>
- Kahn, S. E., Cooper, M. E., & Del Prato, S. (2014). Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *Lancet (London, England)*, 383(9922), 1068–1083. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62154-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62154-6)
- Karastergiou K, and Fried SK (2017). Cellular Mechanisms Driving Sex Differences in Adipose Tissue Biology and Body Shape in Humans and Mouse Models. In (Springer International Publishing), pp. 29–51.
- Kawada, T., Watanabe, T., Takaishi, T., Tanaka, T., & Iwai, K. (1986). Capsaicin-induced beta-adrenergic action on energy metabolism in rats: influence of capsaicin on oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 183(2), 250–256. <https://doi.org/10.3181/00379727-183-42414>

- Kianbakht, S. & Hajiaghaee, R.. (2011). Anti-hyperglycemic Effects of Saffron and its Active Constituents, Crocin and Safranal, in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Journal of Medicinal Plants*. 10. 82-89.
- Kim, J. Y., & Yenari, M. A. (2013). The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. *Anatomy & cell biology*, 46(1), 1–7. <https://doi.org/10.5115/acb.2013.46.1.1>
- Klaus, S., Casteilla, L., Bouillaud, F., & Ricquier, D. (1991). The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *The International journal of biochemistry*, 23(9), 791–801. [https://doi.org/10.1016/0020-711x\(91\)90062-r](https://doi.org/10.1016/0020-711x(91)90062-r)
- Kleiner, S., Mepani, R. J., Laznik, D., Ye, L., Jurczak, M. J., Jornayvaz, F. R., Estall, J. L., Chatterjee Bhowmick, D., Shulman, G. I., & Spiegelman, B. M. (2012). Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 α in adipose tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(24), 9635–9640. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207287109>
- Klingenberg M. (1990). Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue. *Trends in biochemical sciences*, 15(3), 108–112. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90194-g](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90194-g)
- Kocaman, G., Altinoz, E., Erdemli, M. E., Gul, M., Erdemli, Z., Gul, S., & Bag, H. G. (2019). Protective effects of crocin on biochemistry and histopathology of experimental periodontitis in rats. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*, 94(5), 366–373. <https://doi.org/10.1080/10520295.2019.1571229>
- Kong, L., Zhang, W., Liu, S., Zhong, Z., & Zheng, G. (2022). Quercetin, Engelitin and Caffeic Acid of Smilax china L. Polyphenols, Stimulate 3T3-L1 Adipocytes to Brown-like Adipocytes Via β 3-AR/AMPK Signaling Pathway. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 77(4), 529–537. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-00996-x>
- Konstantopoulos, P., Doulamis, I. P., Tzani, A., Korou, M. L., Agapitos, E., Vlachos, I. S., Pergialiotis, V., Verikokos, C., Mastorakos, G., Katsilambros, N. L., & Perrea, D. N. (2017). Metabolic effects of *Crocus sativus* and protective action

against non-alcoholic fatty liver disease in diabetic rats. *Biomedical reports*, 6(5), 513–518. <https://doi.org/10.3892/br.2017.884>

Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of applied genetics*, 54(4), 391–406. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0173-x>

Köhsler, M., Leitsch, D., Müller, N., Walochnik, J., 2020. Validation of reference genes for the normalization of RT-qPCR gene expression in *Acanthamoeba* spp. *Sci. Rep.* 10 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67035-0>.

Kyriakoudi, A., O'Callaghan, Y. C., Galvin, K., Tsimidou, M. Z., & O'Brien, N. M. (2015). Cellular Transport and Bioactivity of a Major Saffron Apocarotenoid, Picrocrocin (4-(β -D-Glucopyranosyloxy)-2,6,6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde). *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(39), 8662–8668. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03363>

Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J. F., Cormont, M., Ricort, J. M., Grémeaux, T., & Grillo, S. (1999). From insulin receptor signalling to Glut 4 translocation abnormalities in obesity and insulin resistance. *Journal of receptor and signal transduction research*, 19(1-4), 217–228. <https://doi.org/10.3109/10799899909036647>

Lee, M. J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular aspects of medicine*, 34(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.001>

Li, W., Huang, E., & Gao, S. (2017). Type 1 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairments: A Systematic Review. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 57(1), 29–36. <https://doi.org/10.3233/JAD-161250>

Liang, H., & Ward, W. F. (2006). PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Advances in physiology education*, 30(4), 145–151. <https://doi.org/10.1152/advan.00052.2006>

Liu, Z., Xu, X. H., Liu, T. Y., Hong, Z. Y., Urade, Y., Huang, Z. L., & Qu, W. M. (2012). Safranal enhances non-rapid eye movement sleep in pentobarbital-treated mice. *CNS neuroscience & therapeutics*, 18(8), 623–630. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2012.00334.x>

- Machado, S. A., Pasquarelli-do-Nascimento, G., da Silva, D. S., Farias, G. R., de Oliveira Santos, I., Baptista, L. B., & Magalhães, K. G. (2022). Browning of the white adipose tissue regulation: new insights into nutritional and metabolic relevance in health and diseases. *Nutrition & metabolism*, 19(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12986-022-00694-0>
- Maeda, A., Kai, K., Ishii, M., Ishii, T., & Akagawa, M. (2014). Safranin, a novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, activates insulin signaling in C2C12 myotubes and improves glucose tolerance in diabetic KK-Ay mice. *Molecular nutrition & food research*, 58(6), 1177–1189. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300675>
- Mansur, N.R., Meyer-Siegler, K., Wurzer, J.C., Sirover, M.A., 1993. Cell cycle regulation of the glyceraldehyde3phosphate dehydrogenase uracil DNA glycosylase gene in normal human cells. *Nucleic Acids Res.* 21 (4), 993–998. <https://doi.org/10.1093/nar/21.4.993>.
- Mashmoul, M., Azlan, A., Khaza'ai, H., Yusof, B. N., & Noor, S. M. (2013). Saffron: A Natural Potent Antioxidant as a Promising Anti-Obesity Drug. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2(4), 293–308. <https://doi.org/10.3390/antiox2040293>
- Matz, J. M., LaVoi, K. P., Moen, R. J., & Blake, M. J. (1996). Cold-induced heat shock protein expression in rat aorta and brown adipose tissue. *Physiology & behavior*, 60(5), 1369–1374. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(96\)00220-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(96)00220-x)
- Medina-Gomez, G., Gray, S., & Vidal-Puig, A. (2007). Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgamma coactivator-1 (PGC1). *Public health nutrition*, 10(10A), 1132–1137. <https://doi.org/10.1017/S1368980007000614>
- Miller, K. N., Clark, J. P., & Anderson, R. M. (2019). Mitochondrial regulator PGC-1 α -Modulating the modulator. *Curr Opin Endocr Metab Res*, 5, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.02.002>
- Montanari, T., Pošćić, N., & Colitti, M. (2017). Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 18(5), 495–513. <https://doi.org/10.1111/obr.12520>

- Moratalla-López, N., Bagur, M. J., Lorenzo, C., Salinas, M. E. M. R., & Alonso, G. L. (2019). Bioactivity and Bioavailability of the Major Metabolites of *Crocus sativus* L. *Flower. Molecules* (Basel, Switzerland), 24(15), 2827. <https://doi.org/10.3390/molecules24152827>
- Moratalla-López, N., Bagur, M. J., Lorenzo, C., Salinas, M. E. M. R., & Alonso, G. L. (2019). Bioactivity and Bioavailability of the Major Metabolites of *Crocus sativus* L. *Flower. Molecules* (Basel, Switzerland), 24(15), 2827. <https://doi.org/10.3390/molecules24152827>
- Morato, P. N., Lollo, P. C., Moura, C. S., Batista, T. M., Carneiro, E. M., & Amaya-Farfan, J. (2013). A dipeptide and an amino acid present in whey protein hydrolysate increase translocation of GLUT-4 to the plasma membrane in Wistar rats. *Food chemistry*, 139(1-4), 853–859. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.062>
- Naresh, G., Jaiswal, N., Sukanya, P., Srivastava, A. K., Tamrakar, A. K., & Narender, T. (2012). Glucose uptake stimulatory effect of 4-hydroxypipericolic acid by increased GLUT 4 translocation in skeletal muscle cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(17), 5648–5651. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.06.101>
- Nedergaard, J., & Cannon, B. (2013). How brown is brown fat? It depends where you look. *Nature medicine*, 19(5), 540–541. <https://doi.org/10.1038/nm.3187>
- Ota, A., & Ulrih, N. P. (2017). An Overview of Herbal Products and Secondary Metabolites Used for Management of Type Two Diabetes. *Frontiers in pharmacology*, 8, 436. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00436>
- Ottaviani E, Malagoli D, Franceschi C. The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol*. 2011; 174:1–4. [PubMed: 21781968]
- Ottaviani, E., Malagoli, D., & Franceschi, C. (2011). The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *General and comparative endocrinology*, 174(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.06.018>
- Parizad, S., Dizadji, A., Habibi, M. K., Winter, S., Kalantari, S., Movi, S., Lorenzo Tendero, C., Alonso, G. L., & Moratalla-Lopez, N. (2019). The effects of geographical origin and virus infection on the saffron (*Crocus sativus* L.)

Peng, X. R., Gennemark, P., O'Mahony, G., & Bartesaghi, S. (2015). Unlock the Thermogenic Potential of Adipose Tissue: Pharmacological Modulation and Implications for Treatment of Diabetes and Obesity. *Frontiers in endocrinology*, 6, 174. <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00174>

Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U. A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., & Schleicher, E. (2019). Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 127(S 01), S1–S7. <https://doi.org/10.1055/a-1018-9078>

Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 285(10), 7153–7164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.053942>

Porter R. K. (2006). A new look at UCP 1. *Biochimica et biophysica acta*, 1757(5-6), 446–448. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.04.012>

Poulos, S. P., Dodson, M. V., & Hausman, G. J. (2010). Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 235(10), 1185–1193. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.010063>

Puigserver, P., & Spiegelman, B. M. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine reviews*, 24(1), 78–90. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0012>

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), 829–839. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81410-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81410-5)

- Ramji, D. P., & Foka, P. (2002). CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *The Biochemical journal*, 365(Pt 3), 561–575. <https://doi.org/10.1042/BJ20020508>
- Rasmussen, J. M., Entringer, S., Nguyen, A., van Erp, T. G., Burns, J., Guijarro, A., Oveisi, F., Swanson, J. M., Piomelli, D., Wadhwa, P. D., Buss, C., & Potkin, S. G. (2013). Brown adipose tissue quantification in human neonates using water-fat separated MRI. *PloS one*, 8(10), e77907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077907>
- Redondo, M. J., & Morgan, N. G. (2023). Heterogeneity and endotypes in type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology*, 19(9), 542–554. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00853-0>
- Rezaee, R., & Hosseinzadeh, H. (2013). Safranal: from an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(1), 12–26.
- Roesler W. J. (2001). The role of C/EBP in nutrient and hormonal regulation of gene expression. *Annual review of nutrition*, 21, 141–165. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.141>
- Rosenwald, M., Perdikari, A., Rülcke, T., & Wolfrum, C. (2013). Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature cell biology*, 15(6), 659–667. <https://doi.org/10.1038/ncb2740>
- Rothwell, N. J., & Stock, M. J. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*, 281(5726), 31–35. <https://doi.org/10.1038/281031a0>
- Russell, R. R., 3rd, Bergeron, R., Shulman, G. I., & Young, L. H. (1999). Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *The American journal of physiology*, 277(2), H643–H649. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.277.2.H643>
- Samarghandian, S., Borji, A., Delkhosh, M. B., & Samini, F. (2013). Safranal treatment improves hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of pharmacy & pharmaceutical*

sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences,
Société canadienne des sciences pharmaceutiques, 16(2), 352–362.
<https://doi.org/10.18433/j3zs3q>

Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 12–22.

Sanchez-Gurmaches J, Hung C-M, Sparks CA, Tang Y, Li H, Guertin DA. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metabolism*. 2012; 16:348–362. [PubMed: 22940198]

Sarjeant, K., & Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9), a008417.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008417>

Sarjeant, K., & Stephens, J. M. (2012). Adipogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9), a008417.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008417>

Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Rudnicki, M. A., Beier, D. R., & Spiegelman, B. M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454(7207), 961–967.
<https://doi.org/10.1038/nature07182>

Shin, S., & Ajuwon, K. M. (2023). Role of heat shock protein 70 in regulation of anti-inflammatory response to curcumin in 3T3-L1 adipocytes. *Nutrition research and practice*, 17(3), 397–407. <https://doi.org/10.4162/nrp.2023.17.3.397>

Shulman G. I. (2014). Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *The New England journal of medicine*, 371(12), 1131–1141. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1011035>

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *J Biotechnol* 75:291–295

- Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., & Langin, D. (2003). Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 278(35), 33370–33376. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305235200>
- Trayhurn, P., & Wood, I. S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *The British journal of nutrition*, 92(3), 347–355. <https://doi.org/10.1079/bjn20041213>
- van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., & Teule, G. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine*, 360(15), 1500–1508. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808718>
- Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N. J., Enerbäck, S., & Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England journal of medicine*, 360(15), 1518–1525. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808949>
- Wang, J., Lee, J., Liem, D., & Ping, P. (2017). HSPA5 Gene encoding Hsp70 chaperone BiP in the endoplasmic reticulum. *Gene*, 618, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.03.005>
- Wang, Q., Somwar, R., Bilan, P. J., Liu, Z., Jin, J., Woodgett, J. R., & Klip, A. (1999). Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Molecular and cellular biology*, 19(6), 4008–4018. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.6.4008>
- Winterhalter, P., & Straubinger, M. (2000). Saffron—Renewed Interest in an Ancient Spice. *Food Reviews International*, 16(1), 39–59. <https://doi.org/10.1081/FRI-100100281>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.016>

- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., & Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1), 115–124. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80611-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80611-X)
- Yang, H. N., Park, J. S., Woo, D. G., Jeon, S. Y., Do, H. J., Lim, H. Y., Kim, J. H., & Park, K. H. (2011). C/EBP- α and C/EBP- β -mediated adipogenesis of human mesenchymal stem cells (hMSCs) using PLGA nanoparticles complexed with poly(ethyleneimine). *Biomaterials*, 32(25), 5924–5933. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.072>
- Yang, Z., Lu, Y., Li, T., Zhou, X., Yang, J., Yang, S., Bu, S., & Duan, Y. (2024). *Osmanthus fragrans* Flavonoid Extract Inhibits Adipogenesis and Induces Beiging in 3T3-L1 Adipocytes. *Foods (Basel, Switzerland)*, 13(12), 1894. <https://doi.org/10.3390/foods13121894>
- Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 8152–8161. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>
- Yıldırım, Ö., & Tatar, E. (2022). The Roles of Heat Shock Protein-60 and 70 and Inflammation in Obesity-Related Kidney Disease. *Cureus*, 14(9), e28675. <https://doi.org/10.7759/cureus.28675>
- Yiannikouris, F., Gupte, M., Putnam, K., & Cassis, L. (2010). Adipokines and blood pressure control. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 19(2), 195–200. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e3283366cd0>
- Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., & Saito, M. (2011). Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 19(1), 13–16. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.105>
- Zimmet, P., Alberti, K. G., Magliano, D. J., & Bennett, P. H. (2016). Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nature reviews. Endocrinology*, 12(10), 616–622. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.105>

Ziqubu, K., Dlodla, P. V., Mthembu, S. X. H., Nkambule, B. B., Mabhida, S. E., Jack, B. U., Nyambuya, T. M., & Mazibuko-Mbeje, S. E. (2023). An insight into brown/beige adipose tissue whitening, a metabolic complication of obesity with the multifactorial origin. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1114767. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1114767>

Zoico, E., Rubele, S., De Caro, A., Nori, N., Mazzali, G., Fantin, F., Rossi, A., & Zamboni, M. (2019). Brown and Beige Adipose Tissue and Aging. *Frontiers in endocrinology*, 10, 368. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00368>



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : S***** T*****

Uyruk : T.C.

Doğum Yeri ve Tarihi: İ*****/K***** 0*/0*/20**

Medeni Hali : Bekar

Telefon : 0 5*****

E-posta : s*****@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Şehit İlhan Küçüksolak Anadolu Lisesi	2018
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2022
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2025

Yabancı Dil

İngilizce	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma			X
Konuşma		X	
Anlama			X
Okuma			X