



**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**3T3-L1 ADİPOZİT HÜCRELERİNDE *VERBASCOSİDE*'İN**  
**ADİPOZİT KAHVERENGİLEŞMESİ ÜZERİNE OLASI**  
**ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. NESLİHAN ESRA AVCİ**

**DANIŞMAN**

**PROF.DR. VURAL KÜÇÜKATAY**

**DENİZLİ - 2021**

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**3T3-L1 ADİPOZİT HÜCRELERİNDE *VERBASCOSİDE*'İN**  
**ADİPOZİT KAHVERENGİLEŞMESİ ÜZERİNE OLASI**  
**ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

DR. NESLİHAN ESRA AVCI

**DANIŞMAN**

PROF.DR. VURAL KÜÇÜKATAY

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 21.04.2020 tarih ve 2020/2 nolu kararı ile desteklenmiştir(2020TIPF011).

**DENİZLİ – 2021**



## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşarak her zaman destek olan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY'a,

Tezimin tasarlanmasından başlamak üzere tüm aşamalarında emeği geçen ve kritik yorumlarıyla beni yönlendiren Doç. Dr. Emine KILIÇ-TOPRAK'a,

Yaşanan bu süreçte yardımlarını esirgemeyen ve bana yol gösteren hocalarım Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT-DÖNMEZ ve Dr. Öğr. Üyesi Onur TOKGÜN ve asistanları Kubilay İNCİ ve Büşra ÇELİKKAYA'ya,

Verilerin istatistiğinin yapılmasına yardımcı olarak Dr. Öğr. Üyesi Hande ŞENOL'a,

Çalışmalarım süresince her konuda sayısız kere danıştığım, bilgi ve tecrübelerini sabırla benimle paylaşan ve bu süreçte bana çok büyük destek olan arkadaşım Arş. Gör. Dr. Fatih ALTINTAŞ'a,

Her zaman varlığını hissettiğim ve yolumu aydınlatan canım arkadaşım Uzm. Dr. Egem Burcu TUZCU'ya,

Tez çalışmam dahil olmak üzere her konuda teknik desteğim, moral kaynağım, hayattaki en iyi arkadaşım ve kardeşim Yusuf AVCİ'ya ve beni hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak bu günlere getiren aileme emekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
ÖZET .....	XII
İNGİLİZCE ÖZET .....	XIII
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
OBEZİTE .....	3
Prevalans.....	3
YAĞ DOKUSU.....	4
Yağ Doku Tipleri .....	5
Yağ Doku Kahverengileşmesi .....	12
3T3-L1 PREADİPOZİT HÜCRE HATTI.....	18
POLİFENOLLER.....	20
Feniletanoid Glikozitler (PhG'ler).....	24
Verbascoside.....	25
Amaç ve Hipotezler .....	27
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	29
3T3-L1 HÜCRE DİZİNİ .....	29
HÜCRE KÜLTÜRÜ .....	29
Kullanılan Kimyasallar .....	29
Hücrelerin İlk Çözdürülmesi .....	30

Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması .....	31
Hücrelerin Sayımı .....	31
Hücrelerin Pasajlanması .....	32
Hücrelerin Dondurulması .....	32
Hücrelerin Çözdürülmesi.....	34
Preadiposit Hücrelerinin Farklılaştırılması.....	34
Stokların Hazırlanması .....	34
Farklılaştırma Mediumlarının Hazırlanması.....	35
Deney Grupları .....	37
Hücrelerin Deneyler İçin Ekilmesi .....	38
3T3-L1 Preadipositlerinin Farklılaştırılması .....	39
<i>Verbascoside</i> Uygulanması.....	42
OİL RED O BOYAMA.....	44
DENEYLERİN SONLANDIRILMASI.....	46
RNA İzolasyonu .....	46
Mikrodizin Analiz İçin Örneklerin Hazırlanması.....	47
GERÇEK- ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU .....	49
cDNA Sentezlenmesi.....	49
Primer Dizileri .....	50
Reaksiyon Kurulumu .....	50
<b>BULGULAR.....</b>	<b>54</b>
OİL RED O BOYAMA SONUÇLARI.....	54
MİKRODİZİN ANALİZİ SONUÇLARI.....	56
RT-PCR SONUÇLARI .....	64
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>68</b>
<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>79</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>80</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ABHD5</b>	Alfa beta hidroksilaz domain protein 5
<b>ACO</b>	Açıl-koenzim A oksidaz
<b>AICAR</b>	5-Aminoimidazol-4-karboksamid-1- $\beta$ -4-ribofuranosid
<b>AMPK</b>	Adenosin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz
<b>ASC</b>	Adipose stem cell
<b>ATGL</b>	Adipoz trigliserid lipaz
<b>ATP</b>	Adenozin trifosfat
<b>BYD</b>	Beyaz yağ doku
<b>C / EBP<math>\beta</math></b>	CCAAT / güçlendirici bağlayıcı protein beta
<b>C / EBP-<math>\delta</math></b>	CCAAT / güçlendirici bağlayıcı protein delta
<b>CaMKII</b>	Ca <sup>2+</sup> / kalmoduline bağımlı protein kinaz II
<b>cAMP</b>	Siklik adenozin monofosfat
<b>CHRNA2</b>	Asetilkolinin kolinerjik reseptör
<b>Cidea</b>	Cell death-inducing DFFA-like effector A
<b>CPT1</b>	Karnitin palmitoiltransferaz-1
<b>Ct</b>	Cycle Threshold
<b>DAG</b>	Diaçilgliserol
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Distile su
<b>Dio2</b>	Tip II iyodotironin deiyodinaz
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>DKSM</b>	Deksametazon
<b>En1</b>	Engrailed-1
<b>FASN</b>	Yağ asidi sentaz
<b>FBS</b>	Fetal bovine serum
<b>Fc</b>	Fold change
<b>GAPDH</b>	Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
<b>GO</b>	Gen ontoloji
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>HFD</b>	Yüksek yağlı diyet
<b>HSL</b>	Hormon sensitif lipaz

<b>IBMX</b>	İzobutilmetilksantin
<b>IGF-1</b>	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
<b>INS</b>	İnsülin
<b>IR</b>	İnsülin direnci
<b>iBYD</b>	İnguinal beyaz yağ doku
<b>Ifi202b</b>	Interferon Activated Gen 202B
<b>KYD</b>	Kahverengi yağ doku
<b>iKYD</b>	İndüklenebilir kahverengi yağ doku
<b>KVH</b>	Kardiyovasküler hastalık
<b>KEGG</b>	Kyoto encyclopedia of genes and genomes
<b>LD</b>	Lipid damlacığı
<b>MAG</b>	Monoaçilgliserol
<b>MAGL</b>	Monoaçilgliserol lipaz
<b>MAPK</b>	Mitojen ile aktive edilen protein kinaz
<b>mASC</b>	Mouse adipose-derived stem cells
<b>MD 1</b>	Medium 1
<b>MD 2</b>	Medium 2
<b>MD 3</b>	Medium 3
<b>Myf5</b>	Miyojenik faktör 5
<b>NAD +</b>	Nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NP</b>	Natriüretik peptid
<b>P/S</b>	Penisilin/streptomisin
<b>PDGFR<math>\alpha</math></b>	Plateletten türetilmiş büyüme faktörü reseptör alfa
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b> <b>(PPARGC1 <math>\alpha</math>)</b>	Peroksizom proliferatör ile aktifleştirilen reseptör gama koaktivatör 1-alfa
<b>PLIN1</b>	Perilipin 1
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör $\gamma$
<b>PRDM16</b>	PR domain-containing protein 16
<b>RMA</b>	Robust multi average
<b>RT-PCR</b>	Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>scBYD</b>	Subkutanöz beyaz yağ doku



<b>SGBS</b>	Simpson-Golabi-Behmel sendromu
<b>SIRT1</b>	Sirtuin 1
<b>SREBP1c</b>	Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı transkripsiyon faktör 1c
<b>T2DM</b>	Tip 2 diabetes mellitus
<b>TAG</b>	Triaçilgliserol
<b>TB</b>	Tam besi yeri
<b>Tfam</b>	Mitokondriyal transkripsiyon faktör A
<b>TG</b>	Trigliserid
<b>Tm</b>	Erime sıcaklığı
<b>TURDEP</b>	Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması
<b>UCP-1</b>	Uncoupling protein-1
<b>VB</b>	Verbascoside
<b>vBYD</b>	Visseral beyaz yağ doku
<b>VKİ</b>	Vücut kitle indeksi
<b>YA</b>	Yağ asidi
<b>YD</b>	Yağ doku
<b>β3 AR</b>	β3 adrenerjik reseptör

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

Şekil 1. Beyaz yağ dokusu şematik görünümü. ....	5
Şekil 2. Termojenik yağ hücrelerinde hücresel metabolizma.....	7
Şekil 3. Farelerde ve insanlarda termojenik yağın anatomik yerleşimleri.....	10
Şekil 4. Beyaz, kahverengi ve bej adipositlerin gelişimi. ....	11
Şekil 5. Kahverengileşme mekanizmasındaki sinyal yollarını şematik gösterimi....	13
Şekil 6. Beyaz yağ dokusunda lipogenez.....	16
Şekil 7. Bazal ve lipolitik uyarı koşullarında PLIN1 ve HSL fonksiyonu şematik gösterimi.....	17
Şekil 8. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma süreci. ....	19
Şekil 9. Polifenollerin sınıflandırılması. ....	21
Şekil 10. Polifenollerin termogenez, lipid metabolizması ve mitokondriyal biyogenez üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi. ....	22
Şekil 11. PhG'lerin potansiyel sağlık yararları.....	24
Şekil 12. Verbascoside'in kimyasal yapısı.....	25
Şekil 13. 3T3-L1 hücre dizisi mikroskopik görünümü.....	29
Şekil 14. Neubauer lamı.....	32
Şekil 15. Farklılaştırma süreci şematik görünümü. ....	42
Şekil 16. Mikrodizin analizi şematik gösterimi. ....	48
Şekil 17. Oil Red O boyama sonuçları (10x, 20x).....	55
Şekil 18. Oil Red O boyama sonuçları (100x).....	56
Şekil 19. RNA kalite kontrol sonuçları.....	57
Şekil 20. Örnekler arasındaki korelasyon analizi. ....	58
Şekil 21. Mikrodizin analizi sonucu ifadesi artan azalan prob sayıları. ....	59
Şekil 22. KEGG heatmap analiz sonuçları. ....	60
Şekil 23. Termogenez yolları analizi.....	61
Şekil 24. PPAR $\gamma$ mRNA ekspresyonunun rölatif değişimleri. ....	64
Şekil 25. AMPK mRNA ekspresyonunun rölatif değişimleri. ....	65
Şekil 26. HSL mRNA ekspresyonunun rölatif değişimleri. ....	65
Şekil 27. PLIN1 mRNA ekspresyonunun rölatif değişimleri. ....	66
Şekil 28. Ifi202b mRNA ekspresyonu ve agarose jel görüntüsü. ....	67

## TABLULAR DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1.</b> VKİ'ye göre ağırlık tanımları. ....	3
<b>Tablo 2.</b> Kahverengi beyaz ve bej adiposit adiposit türleri arasındaki farklar.....	9
<b>Tablo 3.</b> MD 2 içeriği. ....	36
<b>Tablo 4.</b> MD 3 içeriği. ....	37
<b>Tablo 5.</b> MD 1 içeriği. ....	41
<b>Tablo 6.</b> Örneklerin RNA konsantrasyonları.....	47
<b>Tablo 7.</b> Primer dizileri. ....	50
<b>Tablo 8.</b> Reaksiyon karışımı.....	51
<b>Tablo 9.</b> RT-PCR protokolü. ....	51
<b>Tablo 10.</b> V50/kontrol ve V100/kontrol grupları arasında 1,5 kat ve üzeri artış/azalış gösteren ortak genler. ....	62
<b>Tablo 11.</b> Çalışılması planlanan tüm genlerdeki artış/azalış miktarları. ....	63
<b>Tablo 12.</b> Primer seçimi. ....	63

## ÖZET

Yağ dokuda kahverengileşme, enerji tüketimini artırmaya ve obeziteyi azaltmaya yardımcı olan bej yağ doku hücrelerinin sayısını artırma işlemidir. Kahverengileşme etkisine sahip doğal ve toksik olmayan polifenollerin kullanımı obezite karşıtı yeni bir strateji olarak değerlendirilmektedir. Çalışmamızda hipertrofik 3T3-L1 adipositlerinde bir polifenol olan *Verbascoside* (VB) kullanılarak obezite ve ilişkili metabolik bozuklukları önleyici olası mekanizmaları değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla önce farklılaştırılıp daha sonra hipertrofik hale getirilen 3T3-L1 adipositleri iki farklı dozda VB ile inkübe edildi. Oil Red O boyama ile hücrelerde oluşturulan trigliserid birikimi analiz edildi. Mikrodizin analizi yapılarak VB uygulanan gruplarda adipojenik bir gen olan *Ifi202b* ekspresyonunun arttığı tespit edildi. Aynı zamanda RT-PCR ile *PPAR $\gamma$* , *AMPK*, *HSL*, *PLIN1*, *Ifi202b* ekspresyonları değerlendirildi. VB uygulaması tüm gruplarda gen ekspresyonlarını anlamlı düzeyde arttırdı. Birlikte ele alındığında verilerimiz VB'nin kahverengileşmede merkezi bir rol alan transkripsiyon faktörü olan *PPAR $\gamma$*  ve hücre içi enerji üreten yolları aktive eden *AMPK* artışı ile kahverengileşmede, aynı zamanda *HSL* ve *PLIN1* aracılığı ile de lipolizi artırma yönünde bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: *Verbascoside*, polifenol, yağ doku, kahverengileşme

## İNGİLİZCE ÖZET

Browning in adipose tissue is the process of increasing the number of beige adipose tissue cells that help to increase energy consumption and reduce obesity. The use of natural and non-toxic polyphenols with browning effect is considered as a new anti-obesity strategy. In our study, we aimed to evaluate possible mechanisms preventing obesity and related metabolic disorders by using *Verbascoside* (VB), a polyphenol in hypertrophic 3T3-L1 adipocytes. For this purpose, 3T3-L1 adipocytes, which were differentiated first and then made hypertrophic, were incubated with two different doses of VB. Triglyceride accumulation formed in cells by Oil Red O staining was analyzed. By performing microarray analysis, it was found that the expression of an adipogenic gene *Ifi202b* increased in VB applied groups. At the same time, expressions of PPAR $\gamma$ , AMPK, HSL, PLIN1, *Ifi202b* were evaluated by RT-PCR. VB administration significantly increased gene expressions in all groups. Taken together, our data show that VB may have an effect on browning with the increase of PPAR $\gamma$ , the transcription factor that plays a central role in browning, and AMPK, which activates intracellular energy-producing pathways, as well as increasing lipolysis through HSL and PLIN1.

Keywords: Verbascoside, polyphenol, adipose tissue, browning

## GİRİŞ

Obezite, enerji alımı (gıdalardan), enerji tüketimini (fiziksel aktivite) kronik olarak aştığında ortaya çıkar ve bu hayatı tehdit eden birçok hastalığa yakalanma riskini dramatik olarak arttırır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından epidemik bir halk sağlığı sorunu olarak tanımlanmakta olup; obezite salgını ile mücadele eden bir dünyada, yeni tedavi stratejileri aramaya sürekli ihtiyaç vardır. Esas olarak adipositlerden oluşan yağ dokuları, sistemik enerji seviyelerinin düzenlenmesinde önemlidir.

Yağ doku, hücrelerinin içerdiği lipit damlacıklarına ve lipit metabolizmasındaki özelliklerine göre beyaz (uniloküler) ve kahverengi (multiloküler) yağ doku olarak sınıflandırılmaktadır (1). Beyaz yağ doku (BYD), sistemik ihtiyaçlara yanıt olarak yağ asitleri formunda enerji depolayıp salgılamak, kahverengi yağ doku çeşitli uyarılara yanıt olarak ısı üretmek için yağ asitleri ve glikoz dahil substratları yakarlar; bu süreç adaptif titreşimsiz termogenez olarak bilinir.

Son zamanlarda BYD'nin soğuğa maruz kalma ve  $\beta 3$  adrenerjik reseptör ( $\beta 3$  AR) agonisti dahil olmak üzere çeşitli uyarıcılar yoluyla termogeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir (2). Bu fizyolojik durum 'kahverengileşme' olarak nitelendirilmiştir ve bunu gerçekleştiren beyaz adiposit de "bey adiposit" olarak adlandırılmıştır (3). Kahverengileşme, insülin (INS) duyarlılığında ve glukoz metabolizmasında bir iyileşmeye yol açar, böylece kilo kaybına yol açan termogenez ve enerji harcamasını arttırır (4). Bu farklılaşma süreci ise pek çok transkripsiyon faktörünün etkileşimi ile farklı yollar üzerinden uyarılarak gerçekleştirilmektedir. Farklılaşma sürecinin ve burada rol alan faktörlerin tam olarak anlaşılması, belirli hastalıkları kontrol etmek için adiposit hücre sayısının potansiyel manipülasyonunu önemli ölçüde destekleyebilir. Gerçekten de obezite ve metabolik komplikasyonlarına karşı tedavilerin planlanması için adipositlerin farklılaşması, genişlemesi ve endokrin fonksiyonlarının ayrıntılı çalışılması gereklidir. Mevcut obezite tedavisi yöntemleri, ya kalori alımının azaltılmasına (diyetler, farmakolojik yaklaşımlar, bariatrik cerrahi) veya enerji tüketiminin artırılmasına (fiziksel aktivite) dayanmaktadır.

Ancak son zamanlarda artan bir şekilde, beyaz yağın bej yağ dokuya dönüşmesi, obezitenin önlenmesi ve tedavisi için yeni terapötik strateji olarak kabul edilmiştir (5).

Bazı fitokimyasalların, kahverengi ve bej yağ metabolizmasını ve gelişimini düzenleyebileceğine dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır (6–11). Lipoliz ve yağ asidi (YA) oksidasyonu gibi BYD üzerindeki enerji harcamalarında fitokimyasalların rolü son zamanlarda önem kazanan bir araştırma konusudur. Bu fitokimyasallardan olan ve diyetimizde bol miktarda bulunan mikronutrient olan polifenoller, bazı antiobezite ve antidiyabetik aktivitelere atfedilen metabolik sağlık üzerinde faydalı etkilerle ilişkilendirilmektedir (12,13).

Polifenollerin alt grubu fenilpropanoid glikozid ailesinden olan *Verbascoside* (VB)'ın antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser gibi birçok biyolojik aktiviteye ve adenosin monofosfat ile aktive edilen protein kinaz (AMPK) aktivasyonu ile antiobezite etkilerine sahip olduğu bilinmektedir (14–16). Ancak yağ doku kahverengileşmesi pek çok transkripsiyon faktörünün etkileşimi ile gerçekleşmekte olan bir süreç olup; yeni yapılan bir derlemede son zamanlarda sık çalışılan ve mekanizması aydınlatılan polifenollerin hangi gen ekspresyonlarını değiştirerek bu sürece katkıda bulunduğu gösterilmiştir (5).

Literatür taramalarında daha önce spesifik olarak VB'nin yağ doku kahverengileşmesi üzerine olası etkilerinin incelendiği ve varsa mekanizmaların aydınlatıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut veriler ışığında VB'nin adipositlerde kahverengi benzeri fenotipin indüksiyonu ve termogeneze katkıları çalışmamız ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Çalışmamız ile obezite ve ilişkili kronik hastalıkların patogenezinde rol alan hücrel mekanizmalar ve seçtiğimiz polifenolün bunlar üzerindeki etkisi ile ilgili bilgiler literatüre kazandırılacak ve ileri çalışmalarla da desteklenmesiyle obezite gelişiminin önlenmesi ve hatta tedavi edilmesi için yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

## GENEL BİLGİLER

### OBEZİTE

Obezite, aşırı besin alımı ve / veya azalan enerji harcamasından kaynaklanan vücut yağının veya yağ dokusunun (YD) fazlalığı olarak tanımlanmaktadır (17). Obezite, insülin direnci (IR), tip 2 diabetes mellitus (T2DM), dislipidemi ve kardiyovasküler hastalık (KVH) dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklar için risk faktörü olarak bilinmektedir (18).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) yetişkinlerde aşırı kilolu ve obeziteyi vücut kitle indeksi (VKİ)'ne göre tanımlamaktadır. VKİ, yaygın olarak kullanılan basit bir boy ağırlık indeksidir. Kilonun metre olarak boyun karesine bölünmesiyle elde edilir ve ( $\text{kg/m}^2$ ) olarak ifade edilmektedir. VKİ, hem cinsiyet hem de her yaştaki yetişkin için aynı olduğundan, aşırı kilo ve obezitenin popülasyon düzeyinde en yararlı ölçümünü sağlamaktadır (19). Aynı zamanda obezite de sıklıkla kategorilere ayrılmakta olup (Tablo 1) sınıf 3 obezite bazen “aşırı” veya “şiddetli” obezite olarak da adlandırılmaktadır (20).

**Tablo 1.** VKİ'ye göre ağırlık tanımları.

VKİ Sınıflandırılması	
Zayıf	$<18,5 \text{ kg/m}^2$
Normal kilolu	18,5 ile $<25 \text{ kg/m}^2$
Kilolu	25 ile $<30 \text{ kg/m}^2$
Sınıf 1 obezite	30 ile $<35 \text{ kg/m}^2$
Sınıf 2 obezite	35 ile $<40 \text{ kg/m}^2$
Sınıf 3 obezite	$\geq 40 \text{ kg/m}^2$

### Prevalans

2016 yılı DSÖ istatistiklerine göre 18 yaş ve üstü 1,9 milyardan fazla yetişkin fazla kilolu, 650 milyondan fazla yetişkin de obez olarak belirtilmiştir. 18 yaş ve üstü



yetişkinlerin %39'u (erkeklerin %39'u ve kadınların %40'i) aşırı kilolu olarak bulunurken, genel olarak, dünya yetişkin nüfusunun yaklaşık %13'ü (erkeklerin %11'i ve kadınların %15'i) 2016'da obez bulunmuştur. Dünya çapında obezite prevalansı 1975 ile 2016 arasında neredeyse üç katına çıkmıştır (19).

Ülkemizde ise 2010 yılında yapılan “Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II)” sonuçlarına göre Türkiye’de obezite sıklığı %32 bulunmuştur. Çalışma sonuçlarına göre erkeklerde fazla kilonun, kadınlarda ise obezitenin daha yaygın olduğu dikkati çekmektedir. Genel olarak erişkin yaşlardaki Türk toplumunun 2/3’ü kilolu veya obez olup; 1998 yılında yapılan TURDEP-I’e göre kıyaslandığında Türkiye’de 12 yılda obezite sıklığı %44 artmıştır (21).

Tüm bu sonuçlara dayanarak obezitenin küresel çapta hızla artmakta olan bir hastalık olduğu sonucuna varılmış ve araştırmacıları bu hastalığın tedavisine yöneltmiştir. Obezitenin tedavisinde hedef olan vücut ağırlığının azaltılması, yaşam tarzı değişiklikleri (diyet ve egzersiz), lipid metabolizmasının normalleştirilmesi, farmasötik müdahaleler veya bariatrik cerrahiyi içeren çeşitli stratejiler denenmektedir (22).

## YAĞ DOKUSU

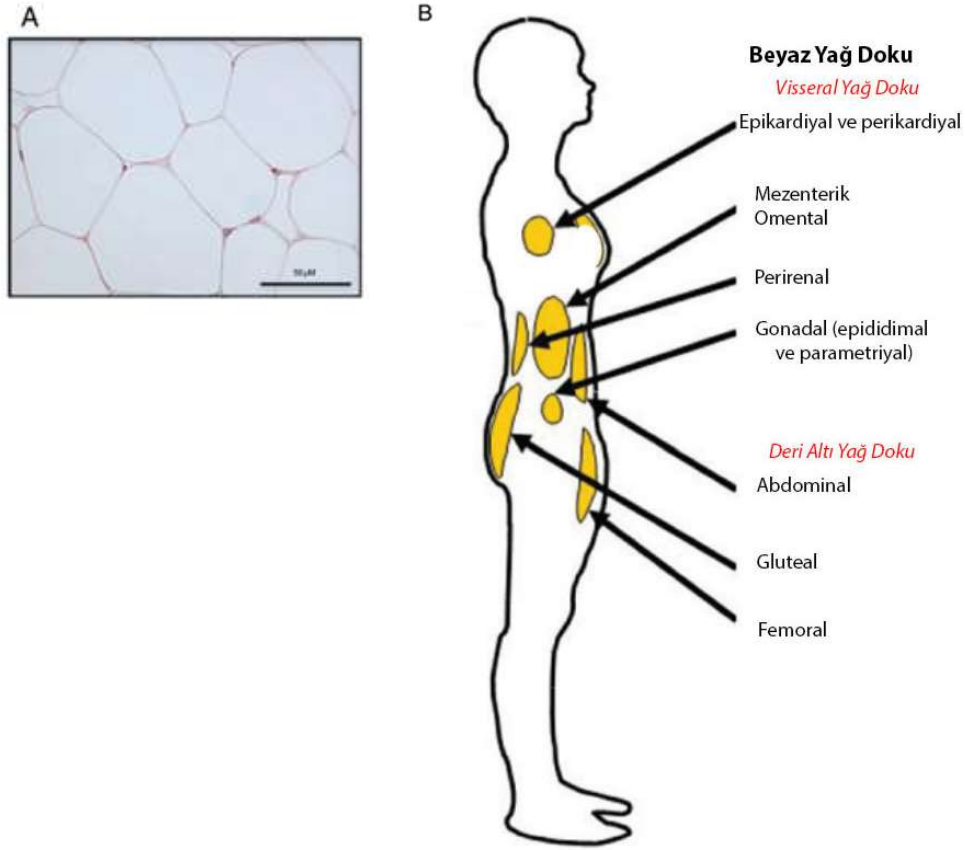
Yağ dokusu (YD), hücreler arası matrikste bulunan farklı hücrelerden oluşan bir organ olup; bu hücreler adipositler, preadipositler, adipoz kök hücreler (ASC, *adipose stem cell*), fibroblastlar ve endotel, sinir ve bağışıklık hücreleridir ve bu hücrelerin birbirleri ile etkileşimleri YD homeostazını sağlamaktadır (23). Beyaz ve kahverengi olmak üzere iki tür yağ dokusu vardır. İlkinin ana işlevi, fazla enerjiyi triaçilgliseroller (TAG) biçiminde depolamaktır, ikincisi ise UCP-1 (ayırıcı protein 1, *Uncoupling Protein-1*) aracılığıyla oksidatif fosforilasyonla elde edilen ATP sentezinden enerjiyi ısı olarak dağıtmak için görev yapmaktadır (24).

## Yağ Doku Tipleri

### *Beyaz Yağ Dokusu (BYD)*

BYD yetişkinlerde predominant yağ deposudur, vücut ağırlığının yaklaşık %20'sine karşılık gelmektedir. Büyük bir lipid damlacığı (LD) ve çevresinde bulunan çekirdekle karakterize beyaz adipositlerden oluşmaktadır (Şekil 1 A) (25).

BYD'nin vücutta visseral beyaz yağ dokusu (vBYD) ve deri altı beyaz yağ dokusu (scBYD) olmak üzere iki deposu bulunmaktadır (26) (Şekil 1 B). Her iki BYD türü de lipid depolama, hormon üretimi, bağışıklık gibi işlevlerde görev almaktadır.



**Şekil 1.** Beyaz yağ dokusu şematik görünümü.

A) Hematoksilen–eozin boyama ile beyaz yağ doku hücrelerinin mikroskopik görüntüleri. B) Beyaz yağ dokusu çeşitleri ve vücutta lokalizasyonu şematik gösterimi. (27,28) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

Bununla birlikte artan vBYD miktarı T2DM ve kardiyovasküler komplikasyonların gelişimiyle (26,29), scBYD birikimi ise gelişmiş INS duyarlılığı ve azalmış T2DM geliştirme riski (26) ile daha fazla bağlantılı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Vücutta kalori ihtiyacı olduğunda, açlık sırasında veya enerji alımının olmadığı zamanlarda, TAG depolanması ve oksidasyon için yağ asitlerinin (YA) salınması, BYD'nin organizmanın enerji dengesinin korunmasında önemli rol oynadığını göstermektedir (30–32).

### ***Kahverengi Yağ Dokusu (KYD)***

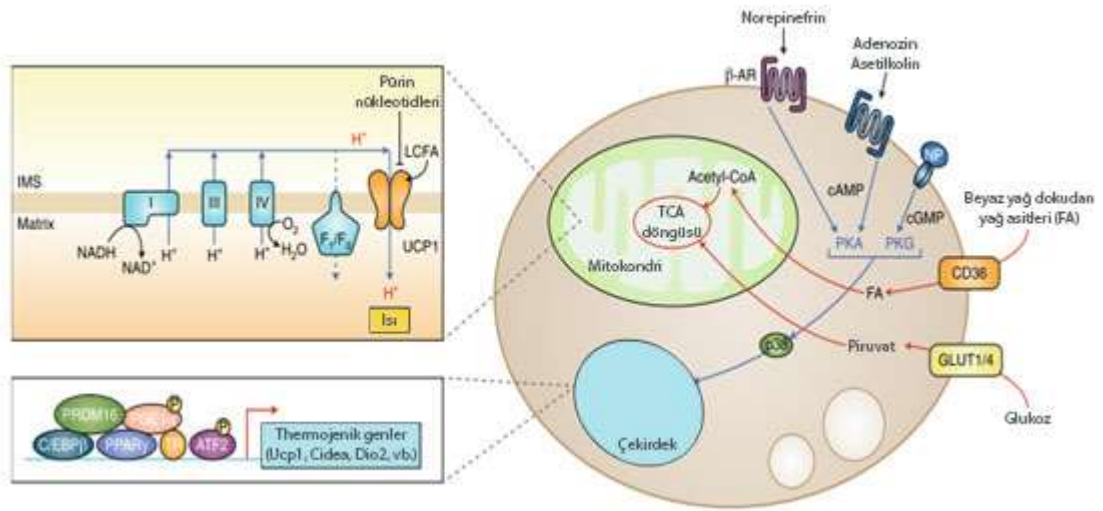
KYD adipositleri, merkezi bir oval çekirdek küçük LD ve iç zarında UCP-1 ekspresyonu özelliğine sahip bol miktarda mitokondri ile karakterizedir (33,34).

İnsanlarda ve diğer memeli türlerinde uzun yıllar boyunca KYD'nin geleneksel olarak neonatal ve erken çocukluk dönemleriyle sınırlı olduğu düşünülmekte olup (35,36); birkaç yıl önce görüntüleme çalışmaları ile UCP-1 ekspresyonu eden adipositlerin yani aktif KYD'nin yetişkin insanlarda, özellikle servikal, supraklaviküler, paravertebral, perikardiyal, mediastinal ve mezenterik alanlarda varlığı ortaya çıkarılmıştır ancak bunların kütlesi, aktivitesi veya her ikisi de obez ve yaşlı hastalarda daha düşük bulunmuştur (37–41). Bebeklerde bulunan ancak yaşla birlikte gerileyen ve yetişkinlerde bulunmayan bir interskapüler KYD deposu da kaydedilmiştir (42,43).

KYD adipositleri, peroksizom proliferasyon aktivasyon reseptörü ve koaktivatör 1 $\alpha$  (PPARGC1 $\alpha$ )(PGC1 $\alpha$ ), tip II iyodotironin deiyodinaz (Dio2), sitokrom C,  $\beta$ 3 adrenerjik reseptör (AR-  $\beta$ 3) gibi ısı üretme kapasitesi ile yakın ilişkisi olan yüksek gen ekspresyonu ile karakterizedir (44).

Çalışmalar, soğuk stresi veya gıda alımına yanıt olarak salınan UCP-1 ekspresyonunun, enerji dengesinin düzenlenmesine (artan glikoz ve serbest YA oksidasyonu) katkıda bulunmasının, ısı oluşumuna yol açtığını ve organizmayı hipotermiden koruduğunu göstermiştir (29,45,46). Oluşan YA ve glikoz, dolaşımdan sırasıyla CD36 ve glikoz taşıyıcı protein 1 veya 4 (GLUT1 / 4) yoluyla aktif olarak alınarak ve UCP-1'e bağlı termogenez için mitokondride oksitlenerek ısı üretimi gerçekleştirmektedir (Şekil 2) (47).

Soğuğa maruz kalmaya yanıt olarak yağ dokusunda, santral sinir sistemi (SSS)'den gelen norepinefrin esas olarak  $\beta$  1-AR ve  $\beta$  3-AR üzerinde etkili olarak PKA ve p38MAPK sinyallerinin aktivasyonuna yol açmakta ayrıca natriüretik peptidler (NP) PKG sinyali yoluyla yağ dokusu termogenezini aktive etmektedir (48). Ayrıca yeni yapılan bir çalışmada, asetilkolinin kolinerjik reseptör (CHRNA2) üzerinde etki ederek ve cAMP-PKA yolu aracılığıyla bej yağ biyogenezini aktive ettiği gösterilmiştir (49). Bu yolların, özellikle PKA-cAMP sinyal yolunun, çekirdekte transkripsiyon faktörlerini uyararak KYD'ye özgü birçok termojenik genin (UCP-1, *Cell death-inducing DFFA-like effector A* (Cidea), DIO2) ekspresyonuna neden olduğu ve mitokondriyal biyogenezi uyardığı bilinmektedir (47,50)(Şekil 2).



**Şekil 2.** Termojenik yağ hücrelerinde hücresel metabolizma.

(47) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

UCP-1, aktive edildiğinde solunum zincirindeki elektron taşınmasını adenozin trifosfat (ATP) oluşumundan ayırır ve böylece depolanan enerjiyi ısı şeklinde serbest bırakır (51).

Ek olarak, kahverengi adiposit kümeleri, üretilen ısının yayılmasına izin vermek için uygun şekilde vaskularize edilir ve termogenezin merkezi kontrolünü sağlayan bol

miktarda sempatik sinir efferent lifleri tarafından yüksek oranda innerve edilir (24,52,53).

Kahverengi adipositlerin yaşa bağılı olarak yok olması, IR gelişmesi ve vücut yağının artması ile ilişkilidir (54). Ek olarak çalışmalar KYD aktivitesi yağ dokusu kütlesi, obezite, VKİ, yaş, IR ve T2DM ile ters orantılı olduğunu ortaya koymaktadır (55,56). Birçok çalışma, KYD'de yaşa bağılı azalmaları tersine çevirmenin veya BYD kahverengileşmesini indüklemenin yaşa bağılı metabolik bozuklukları tedavi etmek için potansiyel bir strateji olabileceğini göstermiştir (57–59). Bununla birlikte, bazı hipermetabolik durumlarda (kanser, yanık ve ağır travma), çalışmalar BYD'de kahverengileşme ve YD kaybı da olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar, BYD kahverengileşmesinin tüm vücut enerji tüketimini arttırdığını, katabolik bir kas protein yıkımına ve lipoliz artışına neden olarak sonuçta kaşeksiye yol açtığını ileri sürmüşlerdir (60).

### ***Bej Yağ Doku***

Son zamanlarda, beyaz veya kahverengi adipositlerden farklı gen ekspresyon modelleri gösteren yeni bir kahverengi benzeri adiposit türü ortaya çıkarılmıştır. Klasik KYD bileşenlerinin aksine bir çalışmada (61) PPAR $\gamma$  (Peroksizom proliferatör ile aktive olan reseptör  $\gamma$ ) agonisti rosiglitazon ile kronik tedaviden sonra beyaz yağ dokusunda başka bir tür adiposit keşfedilmiş; bu diğer adipositler, UCP-1 ve PGC-1 $\alpha$ 'da eksprese eden "Brite (*brown in white*) adipositler" veya "bej adipositler" olarak adlandırılmıştır. Bu hücreler multiloküler şekilde olup; aynı zamanda orta derecede mitokondriyal içeriğe (62) ve UCP-1'in indüklenabilir ekspresyonuna sahiptir (Tablo 2). BYD içerisinde beyaz yağ hücrelerinden diferansiye olarak ortaya çıkabilirler, bu nedenle indüklenabilir KYD (iKYD) (61) olarak da adlandırılmaktadırlar.

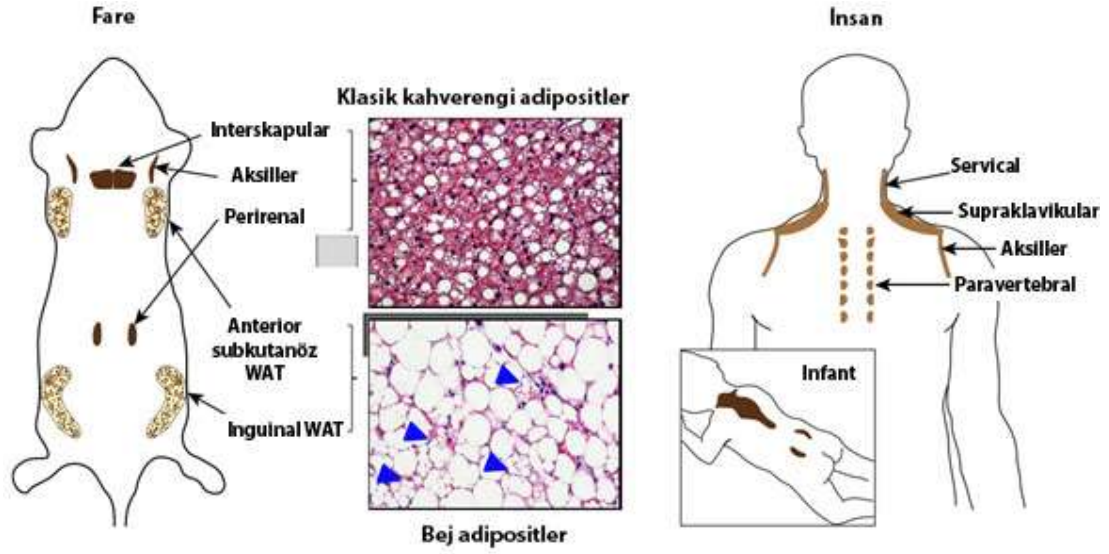
**Tablo 2.** Kahverengi beyaz ve bej adiposit adiposit türleri arasındaki farklar.

	Kahverengi	Beyaz	Bej
<b>Lokasyon</b>	İnterskapular, perirenal, aksiller, paravertebral	İnguinal, mezenterik retroperitoneal, perigonadal, omental	İnguinal BYD içerisinde, diğer scBYD?
<b>Morfoloji</b>	Multiloküler/küçük lipid damlacıkları	Uniloküler/ büyük lipid damlacıkları	Uniloküler büyük / Multiloküler küçük lipid damlacıkları
<b>Fonksiyon</b>	Isı üretimi	Enerjiyi trigliserit şeklinde depolama	Adaptif termogenez
<b>Mitokondri</b>	+++	+	Uyarı ile ++
<b>İnsülin direnci ile korelasyonu</b>	Negatif	Pozitif	Negatif
<b>UCP-1</b>	+++	Neredeyse tespit edilemez	Uyarı ile ++
<b>Vaskülarizasyon/kapiller</b>	Bol miktarda	Düşük	Soğuk uyarımı ile scBYD da anjiyogenez artışı
<b><math>\alpha</math>- <math>\beta</math>-adrenerjik reseptörler</b>	$\beta$ 3 (+++)	$\beta$ 3 (++) , $\alpha$ 2 (+)	$\beta$ 3/ $\alpha$ 2
<b>Obezite</b>	Negatif etkili	Pozitif etkili	Negatif etkili
<b>Belirteçler</b>	UCP-1, Eva1, Pdk4, Ebf3, Hspb7	Ang, Resistin, LPL, G3PDH	Tmem26, Tbx1, Cited1, Shox2
<b>Aktivatörler</b>	Soğuk, Thiazolidinedionlar (PPAR $\gamma$ agonistleri), tiroid hormonları, FGF21, Bmp7, Bmp8b, Natriüretik peptidler	Yüksek yağlı diyet	Soğuk, Thiazolidinedionlar (PPAR $\gamma$ agonistleri), Natriüretik peptidler, FGF21, irisin, katekolaminler, $\beta$ -adrenerjik reseptör agonistler

(63) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

KYD'ye benzer şekilde, iKYD ayrıca termojenik kapasiteye sahiptir (64) ve kilo alımını ve metabolik bozuklukları önler ve ayrıca tüm vücut enerji regülasyonunda (65,66) rol oynar.

Bej adipositler, kemirgenlerde önemli bir deri altı deposu olan inguinal BYD'de (iBYD) en bol miktarda bulunur (67). Bununla birlikte, UCP-1 eksprese eden adipositler, soğuk maruziyetine yanıt olarak BYD depolarının hepsi değilse de çoğunda belirginleşmektedir (67–69). BYD'deki bej hücreler, klasik kahverengi adipositlerden farklı olan ve beyaz adiposit hücre kökenine daha yakın olan öncül hücrelerden kaynaklanmaktadır (61).



**Şekil 3.** Farelerde ve insanlarda termojenik yağın anatomik yerleşimleri.

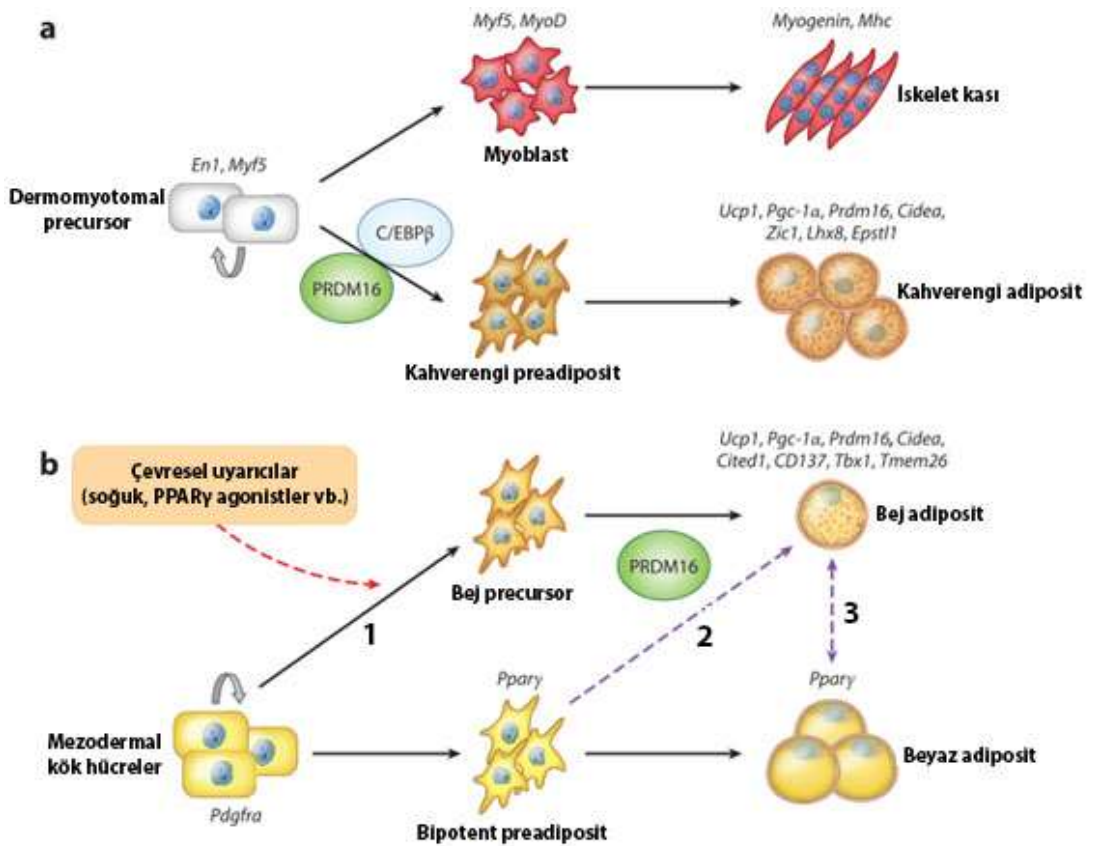
Ok başları multiloküler bej adipositleri göstermektedir. (70) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

### ***Beyaz, Kahverengi ve Bej Adipositlerin Gelişimi***

Klasik KYD ve BYD farklı gelişimsel kökene sahip olup; genetik haritalama deneyleri, interskapular bölgede ve iskelet kasında bulunan kahverengi adipositlerin, daha önce neredeyse sadece iskelet kası öncülerinde mevcut olduğu varsayılan bir gen olan Miyojenik faktör 5 (Myf5)'i ifade eden hücrelerden ortaya çıktığını göstermektedir (71).

Bununla birlikte, BYD ve indüklenebilir termojenik adipositler olan bej adipositler, Myf5 negatif hücre soyundan kaynaklanır ve bu nedenle, klasik kahverengi adipositlerinkinden farklı kökenlere sahiptir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, abdominal BYD'deki Pdgfr $\alpha$ + progenitörlerin, in vivo bir  $\beta$ 3-adrenoseptör agonistine yanıt olarak UCP-1+ adipositlere yol açtığını göstermiştir (72). Subkutan BYD içindeki neredeyse tüm adipositler, fareler soğuğa maruz kaldığında veya uzun bir süre için bir  $\beta$ 3-adrenoseptör agonisti ile tedavi edildiğinde UCP-1(+) hücreler haline gelebilir (73). İnguinal BYD'deki adipositlerin yaklaşık %62'si ayrıca Myf5 (+) hücrelerden de kaynaklanmaktadır (74), bu da subkutan BYD'de adipojenik öncüllerin yüksek heterojenite gösterdiğini ortaya koymaktadır.

PPAR $\gamma$  ve C / EBP'ler, adiposit farklılaşmasını kontrol eden başlıca transkripsiyon faktörleri olarak bilinmektedir (75). C / EBP $\beta$ , beyaz adipositlere göre kahverengi adipositlerde daha yüksek oranda eksprese edilir ve kahverengi adipositlerde termojenik gen programının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (76–78). C / EBP $\beta$ , C / EBP- $\delta$  ve diğer transkripsiyon faktörleri de PPAR $\gamma$  gen ekspresyonunu düzenleyerek adipogenezin transkripsiyonel regülasyonunda görev almaktadır (79).



Şekil 4. Beyaz, kahverengi ve bej adipositlerin gelişimi.

İki tip termojenik adiposit (klasik kahverengi adipositler ve bej / brite hücreler) ayrı gelişimsel kökenlere sahiptir. (a) KYD ve iskelet kası Engrailed-1 (En1) ve Myf5'i ifade eden dermomiyotomdaki öncüllerden kaynaklanır. Somitte kahverengi yağ kaderi, embriyonik gelişim sırasında PRDM16 ve C / EBP $\beta$  dahil olmak üzere transkripsiyonel düzenleyiciler tarafından belirlenir. (b) PDGFR $\alpha$  eksprese eden adiposit öncülleri, kronik soğuğa maruz kalma, egzersiz ve PPAR $\gamma$  agonistleri (kırmızı ok) dahil olmak üzere çeşitli çevresel uyarılara yanıt olarak PRDM16 ile esas olarak deri altı beyaz yağ dokusunda bej / brite hücrelere farklılaşır. Bu hücreler, (1) tanımlanmış bej öncüllerden, (2) beyaz öncül olan bipotent preadipositlerden direk farklılaşma ile veya (3) olgun beyaz adipositlerden transdiferansiyasyon ile türetilmiş gibi görünmektedir. Kesikli mor oklar, daha fazla araştırılması gereken varsayımsal ilişkileri göstermektedir. (80) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.



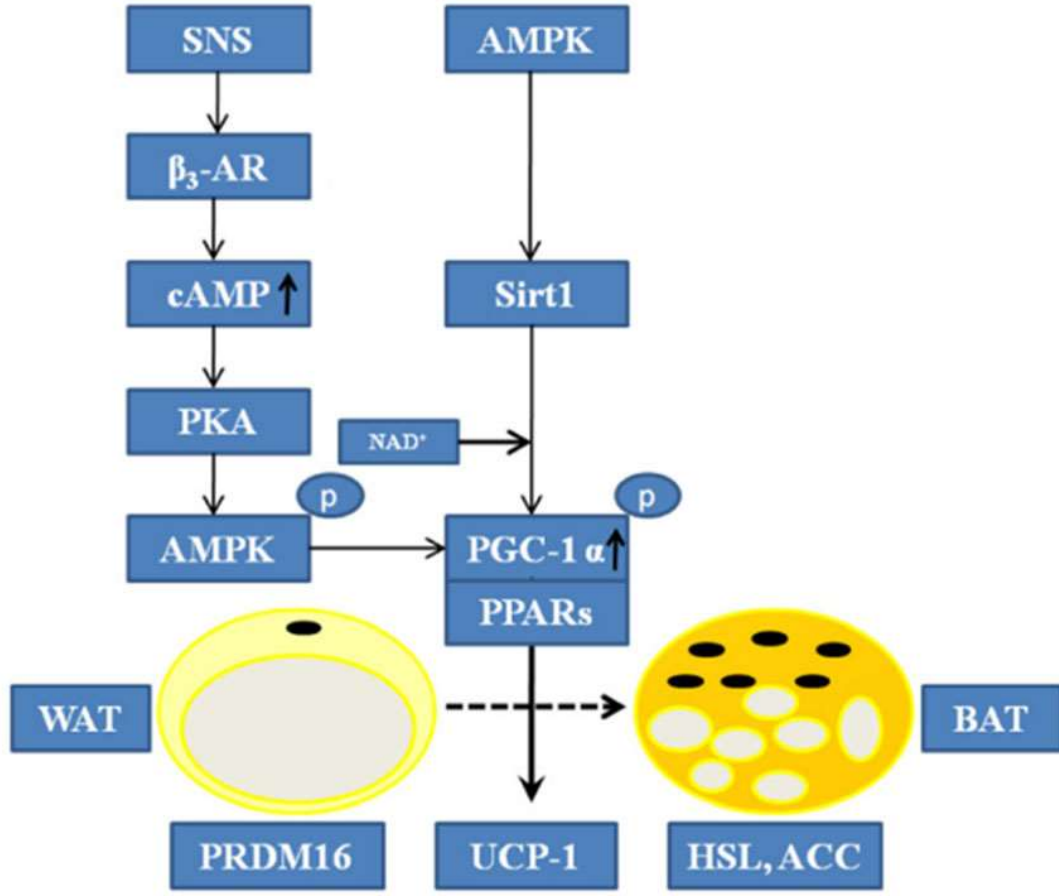
## **Yağ Doku Kahverengileşmesi**

Kronik soğuk stres veya biyoaktif bileşikler nedeniyle BYD'deki kahverengi adiposit benzeri fenotipin indüksiyonu yani BYD'de de bulunan bej adipositlerin artışı "kahverengileşme" olarak adlandırılmaktadır (81). Yağ dokuda gerçekleşen bu süreç, dolaşımdaki hormonlara, transkripsiyonel faktör değişikliklerine ve akut/ kronik soğuğa maruz kalmaya göre değişmekte, diyet ve egzersiz gibi çeşitli çevresel faktörler tarafından düzenlenmektedir (46,82–84). Kahverengileşme ile termojenik aktivite ve enerji tüketimi artarak kilo kaybına yol açmaktadır (8,85). Çalışmalar, BYD'de artmış kahverengileşmenin obezlerde metabolizmayı iyileştirdiğini göstermiştir (4,86).

Aynı zamanda inguinal BYD'de de bulunan bej adipositler, çevresel soğuğa maruz kalan öncül hücrelerden kaynaklanan, çevresel ısıya maruz kaldıklarında yine beyaz adipositlerin morfolojisini ve gen ekspresyon profilini gösterebilir ve soğuğa ikinci kez maruz kaldığında, bej bir adipositin özelliklerini yeniden kazanabilir bu durum kahverengileşme sürecinin dinamik olduğu göstermektedir (87). Bu kanıt, kahverengileşme sürecinin plastisiteye sahip olduğunu, aynı zamanda *de novo* farklılaşma ve transdiferansiasyondan bağımsız bir süreç olduğunu göstermektedir.  $\beta$  3-AR ile uyarıldığında bej adipositlere veya fareler yüksek yağlı bir diyetle beslenirse beyaz adipositlere farklılaşabilen, PDGFR $\alpha$  (+) adiposit öncü hücrelerde de gözlenen süreç yağ plastisi olarak adlandırılmaktadır (87).

## ***AMPK***

Adenozin monofosfat-aktive edici protein kinaz (AMPK), beyin, karaciğer, iskelet kası ve KYD'de yüksek oranda eksprese edilen ve enerji metabolizmasında ve termogenezin düzenlenmesinde rol oynayan bir enzimdir (88) (Şekil 5).



**Şekil 5.** Kahverengileşme mekanizmasındaki sinyal yollarını şematik gösterimi.

(89) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

AMPK, hücresel enerji düşük olduğunda glikoz ve YA alımını ve oksidasyonunu aktive etmektedir. Enzim kompleksi bir katalitik  $\alpha$  alt birimi ve iki düzenleyici alt birim  $\beta$  ve  $\gamma$  olmak üzere üç alt birimden oluşmaktadır. Katalitik  $\alpha$  alt birimi esas olarak kemirgenlerde bulunmaktadır ve  $\alpha 1$  izoformu beyinde ve BYD'de baskın iken  $\alpha 2$  esas olarak kasta ifade edilmektedir. C57Bl / 6 farelerinde, AMPK $\alpha 1$  esas olarak KYD'de de ifade edilen baskın izoform olarak bulunmuştur (90).

PGC-1 $\alpha$  orijinal olarak kahverengi yağ hücrelerinden PPAR $\gamma$ 'nın soğukla indüklenebilir bir transkripsiyonel koaktivatörü olarak tanımlanmıştır (91). PGC-1 $\alpha$ , UCP-1'in transkripsiyonel indüksiyonu için çeşitli nükleer reseptörleri ve mitokondriyal biyogenez ve oksidatif metabolizma ile ilgili diğer mitokondriyal

genleri koaktive etmektedir (92). Beyaz adipositlerde PGC-1 $\alpha$ 'nın ektopik ekspresyonu, mitokondriyal genlerin ve termojenik genlerin ekspresyonunu indüklemektedir (91,93). Sonuçlarla tutarlı olarak, PGC-1 $\alpha$ 'nın delesyonunun, in vivo soğuk kaynaklı termogenez kapasitesini ve kahverengi yağ hücrelerinde cAMP sinyaline yanıtı azalttığı bildirilmiştir (94,95). Bununla birlikte, PGC-1 $\alpha$  kaybının kahverengi adiposit farklılaşmasını etkilemediği gösterilmiştir (94–96).

Enerji metabolizmasının iki temel düzenleyicisi olan AMPK ve Sirtuin İzofrom 1 (SIRT1), PGC-1 $\alpha$  ekspresyonunu ve fosforilasyonu artırabilir (97,98). Dahası, AMPK, PGC-1 $\alpha$  deasetilasyon ve aktivasyonu indüklemek için hücrel nikotinamid adenin dinükleotid (NAD +) seviyelerini artırarak SIRT1 aktivitesini de artırabilir (99,100). SIRT1 termogenezin bir başka önemli düzenleyicisidir ve birincil rolü PPAR $\gamma$ 'yı deasetile etmektir (101). BAT genlerinin indüksiyonuna ve WAT genlerinin baskılanmasına yol açan PRDM16'yı aktive etmek için PPAR $\gamma$ 'nın deasetilasyonu gereklidir (2). AMPK / PGC-1 $\alpha$  sinyalizasyonu baskın olarak kahverengi ve bej yağda farklılaşmayı düzenlemektedir (88,100,102). Bu etkilerle AMPK ve SIRT1, BYD'nin kahverengileşmesini indükleyerek mitokondriogenezi de uyarmaktadır (99).

### ***PPAR $\gamma$***

Peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptörler (PPAR'lar), hücrel farklılaşmayı, gelişmeyi ve enerji metabolizmasını ve tümör oluşumunu düzenleyerek işlev gören bir grup nükleer transkripsiyon faktörü olarak bilinmektedir. Üç tür PPAR bulunmaktadır; PPAR $\alpha$ ,  $\beta / \delta$  ve  $\gamma$ .

İnsanlarda, PRKAA1 ve PRKAA2 (103) genleri tarafından kodlanan iki  $\alpha$ -alt birimi ( $\alpha$ 1 ve  $\alpha$ 2), PRKAB1 ve PRKAB2 (104) tarafından kodlanan iki  $\beta / \delta$  alt birimi ( $\beta$ 1 ve  $\beta$ 2), PRKAG1, PRKAG2 ve PRKAG3 tarafından kodlanan 3  $\gamma$  alt birimi ( $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 ve  $\gamma$ 3) (105) vardır.

PPAR $\gamma$  esas olarak BYD, iç organlar ve makrofajlarda ifade edilmektedir. Olgun adipositlerde PPAR $\gamma$ , serbest YA alımı ve trigliserit sentezinde yer alan genlerin ekspresyonunu düzenler, böylece BYD'nin trigliserit depolama yeteneğini arttırmaktadır (106). PPAR $\gamma$  agonisti tiazolidindionların kahverengi adiposite özgü genlerin ekspresyonunu uyarıp ve vBYD genlerini inhibe ederek beyaz adipositlerde

kahverengileşmeyi indüklediği gösterilmiştir (107). PPAR $\gamma$  'nin sentetik ligandı rosiglitazon ile aktivasyonu, PRDM16 yolağının aktivasyonu yoluyla beyaz adiposit hücre hatlarında ve murin BYD'de kahverengi adipositler ve mitokondriyal biyogenez için spesifik genlerin ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir (61,108). PPAR $\gamma$  ligand bağlanma bölgesinin mutasyonu, 3T3-L1 adipositlerinde troglitazon ile ilişkili beyaz yağ genlerinin inhibisyonunu önlediği bildirilmiştir (107). BYD'de PPAR $\gamma$  düzeylerinin arttırılması, obeziteyi tedavi etmek için potansiyel bir strateji olarak önerilmektedir (109).

PPAR $\alpha$  ise esas olarak karaciğer, böbrek, kalp, kas ve adipoz dokusunda eksprese edilir ayrıca triaçilgliserolden zengin lipoproteinlerin plazma konsantrasyonunu azaltıp mitokondriyal ve peroksizomal oksidasyonu indükleyerek fibrat grubu antidiyabetik ilaçların hipotrigliseridemik etkisine aracılık ettiği gösterilmiştir (110). Diyetle indüklenen obezite modeli ile yapılan bir çalışmada, PPAR $\alpha$  agonisti fenofibratın kilo kaybına neden olduğu ve kahverengi adipositlerde  $\beta$ 3-AR, PGC-1 $\alpha$  ve UCP-1'i arttırdığı gösterilmiştir (111).

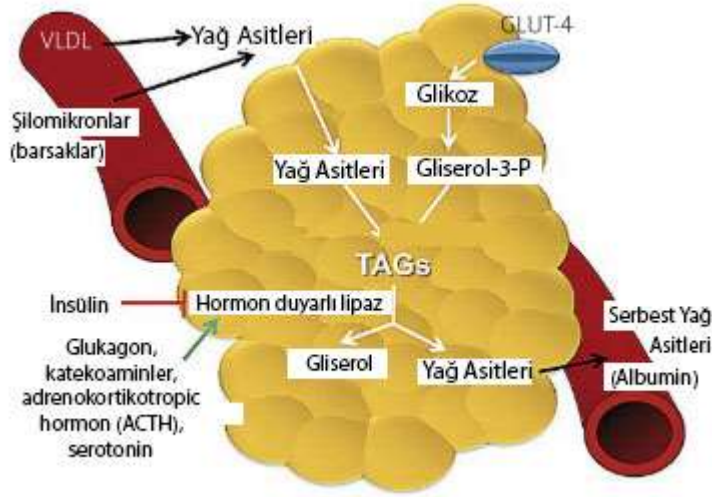
PPAR $\beta$ , adipositlerde lipid depolanmasını sağlayan ve esas olarak beyinde, KYD'de ve deride ifade edilen adipogenezin merkezi düzenleyicilerinden biri olarak bilinmektedir (102). PPAR $\beta$ , YA oksidasyonu ve enerji harcanması için gerekli genlerin ekspresyonunu düzenler, bu da lipit profillerinin iyileşmesine ve yağlanmanın azalmasına yol açar (112).

### ***Perilipin 1 (PLIN1) ve Hormon Sensitif Lipaz (HSL)***

Adipositler enerji depolamak için, serbest yağ asitlerini lipogenez yoluyla trigliseritlere dönüştürürken, trigliseritleri lipoliz yoluyla metabolize ederek enerji üretmektedirler (113).

Beyaz yağ dokusundaki yağ birikimi, yağ sentezi (lipogenez) ve yağ parçalanması (lipoliz / YA oksidasyonu) (Şekil 6) arasındaki denge ile belirlenmektedir. Lipogenez, tercihen beyaz yağ dokusunda oluşan bir süreçtir, ancak karaciğerde de meydana gelir ve enerji rezervi olarak kullanılan yağ asitlerinin (FA) ve TAG sentezi olup; diyetdeki değişikliklere duyarlıdır (114). Yüksek karbonhidratlı diyetle uyarılarak yemek sonrası plazma trigliserid seviyelerinin yükselmesine neden

olurken, lipogenez çoklu doymamış yağ asitleri ve açlık tarafından inhibe edilmektedir (25).



**Şekil 6.** Beyaz yağ dokusunda lipogenez.

(25) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

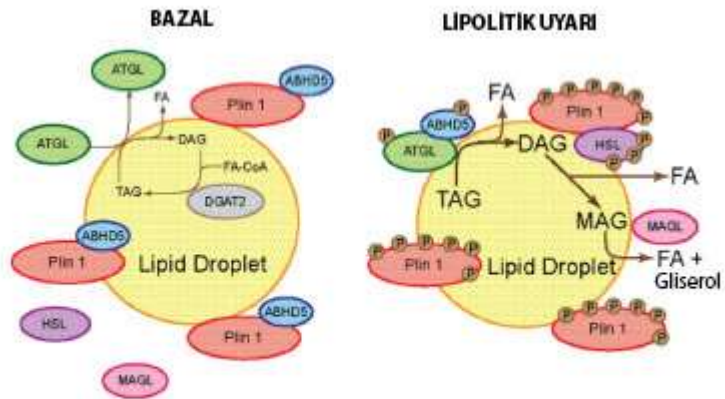
Perilipinler, adipositlerdeki LD ile ilişkili başlıca proteinler olarak bilinmektedir ve Perilipin (PLIN)1-5 olmak üzere tanımlanmış 5 çeşit perilipin bulunmaktadır (115,116) ve PLIN1, ağırlıklı olarak adipositlerde eksprese edilmektedir.

PLIN1, olgun adipositlerde bol miktarda eksprese edilir adrenaline ile uyarılan akut lipoliz sırasında cAMP'ye bağlı protein kinaz (PKA) tarafından fosforile edilir, 3T3-L1 adipositlerinin lipid biriken olgun adipositlere farklılaşması sırasında adipositlerdeki LD yüzeylerinde PLIN1 içeren bir fosfolipid tek katman şeklinde lokalize olmaktadır (117).

PLIN1, hücre kültürü ve perilipin delesyonlu farelerde yapılan deneylerde ve nadir insan mutasyonları çalışmasında gösterildiği gibi, bazal (veya beslenme) koşullar altında yağ lipolizini sınırlamada çok önemli bir rol oynamaktadır. Tipik olarak lipid damlacıklarını PLIN2 ile kaplayan hücre kültürlerinde PLIN1 ekspresyonu, perilipin 1 kaplı lipid damlacıklarına ve TAG döngüsünün azalmasına bağlı olarak artan TAG depolamasına yol açmaktadır (118,119). Tutarlı bir şekilde, PLIN1 delesyonlu farelerde yağ lipid damlacıkları PLIN2 ile kaplanır ve TAG döngüsü

hızlanır, bu da yağ dokusu kütleğinde yaklaşık %70'lik bir azalmaya yol açmaktadır (120,121).

Lipoliz ise (Şekil 6), BYD'de hormonal uyarımla aktive edilir ve üç ester bağının, adipoz trigliserid lipaz (ATGL), hormona sensitif lipaz (HSL) ve monogliserid lipazın (MAGL) ardışık eylemleri ile hidrolizini kapsamaktadır. ATGL, diaçilgliserol (DAG) oluşturmak için TAG'ı hidrolize eder ve HSL daha sonra bir ester bağını hidrolize ederek DAG'ı monoaçilgliserole (MAG) dönüştürür (122). Son olarak, MAG, MAGL tarafından hidrolize edilir. PLIN1 ve HSL, adrenalin ve G proteinine bağlı  $\beta$  reseptörlerinin etkileşimleriyle aktivasyonu takiben PKA tarafından fosforile edilmektedirler (Şekil 7). Bazal koşullar altında, PLIN1 ve ATGL, LD yüzeylerinde ortak lokalize edilir ve LD ile ilişkili alfa beta hidroksilaz domain protein 5 (ABHD5) ; PLIN1 ile bir kompleks oluşturur (123). PLIN1'in fosforilasyonu üzerine, ABHD5 serbest kalarak ATGL'ye bağlanıp aktive eder (124).



**Şekil 7.** Bazal ve lipolitik uyarı koşullarında PLIN1 ve HSL fonksiyonu şematik gösterimi.

(125) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

### 3T3-L1 PREADİPOZİT HÜCRE HATTI

3T3-F442A ve 3T3-L1 hücreleri 17 ila 19 günlük İsviçre 3T3 fare embriyolarından türetilmiş, 3T3 hücre hattından izole edilip ayrıştırılmış, en sık kullanılan preadiposit hücre hatları olup preadipositlerin adipositlere dönüşümünü incelemek için iyi karakterize edilmiş ve güvenilir bir model olarak bilinmektedir (126,127).

Çoğunlukla ölümsüzleştirildiği düşünülse de 3T3-L1 hücrelerinin adipositlere farklılaşma kapasitesinin, artan pasaj sayısı ile azaldığı bilinmektedir. Bu hücre hatları, preadiposit farklılaşması için gerekli olan anahtar moleküler belirteçlerin, transkripsiyon faktörlerinin ve çeşitli etkileşimlerin tanımlanmasında oldukça yararlı olmuştur ve bu nedenle, çeşitli ajanların veya hücreSEL düzensizliklerin adipojenik potansiyelini hızla araştırmak ve değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır (128).

Çoğalma sırasında, tüm preadipoz hücre modelleri, fibroblastlara benzer bir morfoloji göstermektedir. Farklılaşmanın indüksiyonu, küresel hale gelen ve LD ile dolu olan preadipositlerin derin fenotipik değişikliklerini tetikleyerek, in vivo olarak farklılaşmış adipositlerin birçok morfolojik ve biyokimyasal özelliklerini göstermektedir (129).

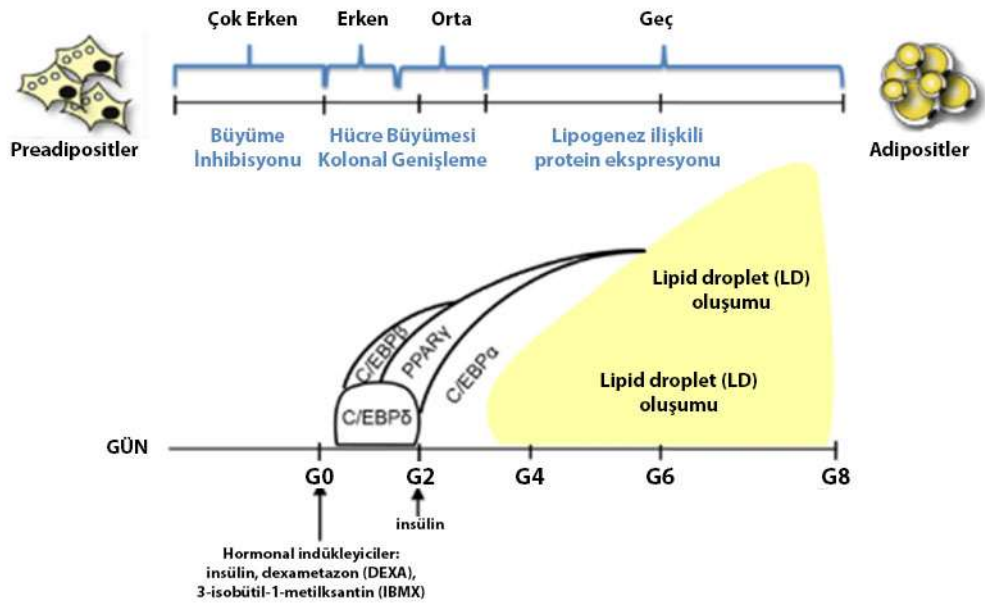
Konfluent 3T3-L1 preadipositler, tanımlanmış bir adipojenik farklılaştırma kokteyli ile eşzamanlı olarak farklılaştırılmaktadır. Bunun için INS, glukokortikoidler ve fetal sığır serumu varlığında hücre içi cAMP seviyelerini yükselten izobutilmetilksantin (IBMX) kombinasyonu ile 48 saatlik erken hormonal indüksiyonu sağlanarak maksimum farklılaşma elde edilir (130). Deksmetazon (DKSM), farklılaşmanın erken aşamalarında güçlü bir adipogenez indüktörüdür ancak adiposit olgunlaşmasının sonraki aşamalarında eklendiğinde anti-adipojenik etkiler sergilediği gösterilmiştir, bu da hücre hattında hormonların etkilerinin zamana bağlı olduğunu ortaya çıkarmıştır (130).

3T3-L1 hücreleri dahil olmak üzere bazı yerleşik hücre hatları, adiposit farklılaşmasının, transkripsiyon faktörlerinin sıralı ekspresyonunun bir sonucu olduğunu göstermektedir. Belirli stimülasyon türleri altında, preadipositler, farklılaşmanın son aşamasında olgun adipositlere dönüştürülür (131). Bu süreç,

CCAAT/ güçlendirici bağlayıcı protein (C / EBP) ailesinin iki üyesinin induksiyonuna bağlıdır: C / EBP- $\beta$  ve C / EBP- $\delta$  (63).

Adipojenezin ilk aşaması, preadipositlerin çoğalması ile karakterizedir ve hücre döngüsünün çok erken aşamalarında preadipositler mitotik aktivite göstermektedir. Bu noktada, preadipositler hücre döngüsüne yeniden girer ve hücre döngüsünden çıkıncaya kadar mitotik klonal genişlemeye ve morfolojilerini değiştirip, sitoplazmalarında trigliserit birikimiyle karşımıza çıkarak, olgun adipositlerin metabolik özelliklerini kazanırlar (132).

Kaskad hücre dışı sinyallerle başlatılır ve hücrelerin farklılaşma kokteyli içeren ortama maruziyetini izleyen 24-48 saat içinde C / EBP- $\beta$  ve C / EBP- $\delta$  ekspresyonunda geçici bir artışa neden olur. 3T3-L1 hücrelerindeki son araştırmalar, C / EBP  $\delta$  'nın mitotik klonal genişlemede önemli rolü olduğunu ileri sürmektedir (133) (Şekil 8).



**Şekil 8.** 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma süreci.

(134) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

Burada kullanılan DKSM sentetik bir glukokortikoid agonistidir (130). Ancak bu süreçte DKSM tedavisi, transkripsiyon faktörü C / EBP- $\beta$  'yı etkinleştirdiği için



farklılaşmayı indüklemeye önemlidir. IBMX, hücre içi cAMP seviyelerini artıran ve transkripsiyon faktörü C / EBP- $\delta$  'nin aktivasyonuna yol açan bir fosfodiesteraz inhibitörüdür ve INS, hücre döngüsünün yeniden girişini ve eşzamanlı hücre bölünmesini (mitotik klonal genişleme) destekleyen bir adipogenez uyarıcı hormon olarak rol oynamaktadır (63).

Adipogenez, birçok hormon, sitokin ve büyüme faktöründen pozitif veya negatif olarak etkilenebilir. İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), tiroid hormonları, glukokortikoidler, mineralokortikoidler, PPAR $\gamma$  agonistlerinin farklılaşmayı uyardığı, bunların aksine androjen, östrojen ve proinflamatuvar sitokinler farklılaşmayı inhibe edici etkilere neden olur. Özellikle, TNF $\alpha$ 'nın, C / EBP- $\beta$   $\alpha$  ve PPAR $\gamma$  ekspresyonunda belirgin bir azalma yoluyla, olgun adipositlerde de intrasitoplazmik lipidlerin miktarını azalttığı, onlara preadipositlerin fenotipini sağladığı gösterilmiştir (135–137). Olgun adipositlerin, terminal farklılaşmasının tamamlanmasının ardından bölünme yeteneklerini yitirdiklerine inanılmaktadır (138).

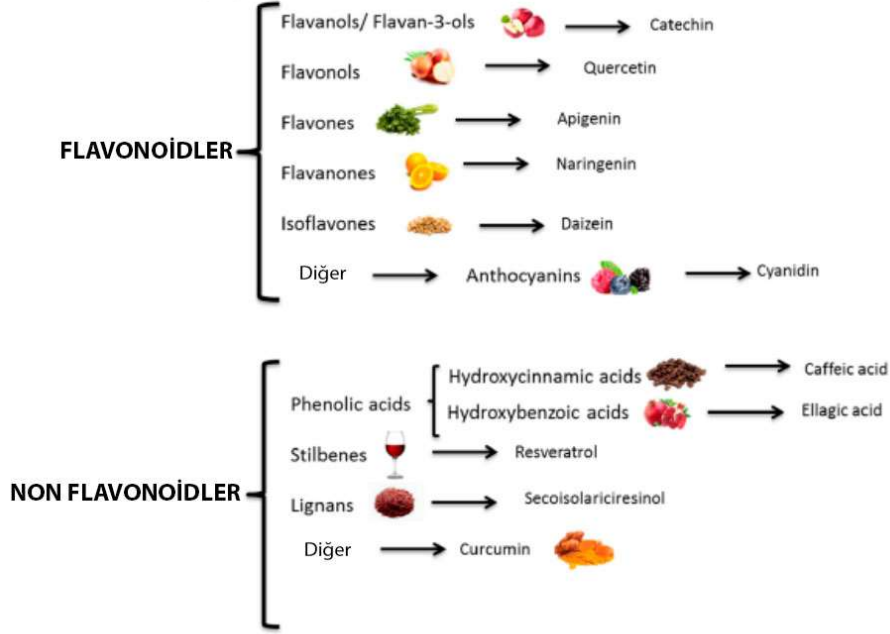
## **POLİFENOLLER**

PP'ler, şikimik asit yolu ile üretilen büyük bir bitki fenollerine sınıfına aittir (139). Literatür, gıda kaynaklı bileşenlerin, özellikle de polifenollerin, obezite ve komorbiditelerinin önlenmesinde ve yönetilmesinde hayati bir rol oynadığını göstermektedir (140).

Şu ana kadar tanımlanmış yaklaşık 8000 farklı polifenol bulunmaktadır; bu moleküller, aromatik bir halka üzerindeki hidroksil gruplarından oluşan ortak bir fenolik yapıyı paylaşır. Polifenoller kimyasal olarak fenolik yapısal özelliklere sahip bileşikler olarak karakterize edilmelerine rağmen, bu doğal ürünler grubu oldukça çeşitlidir ve birkaç alt fenolik bileşik grubu içerir. Meyveler, sebzeler, tam tahıllar, çikolata gibi yiyecek ve çay, şarap gibi diğer içecek türleri, zengin polifenol kaynakları olarak bilinmektedir (141).

Polifenollerin bitkilerdeki çeşitliliği ve geniş dağılımı, bu doğal olarak oluşan bileşiklerin sınıflandırmanın farklı şekillerini karşımıza çıkarmıştır. En yaygın olarak polifenoller, kökenlerine, biyolojik işlevlerine ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmıştır (142). Kimyasal olarak polifenoller, hidroksile fenil kısımları ile

karakterize edilen büyük heterojen bir bileşik grubudur bu nedenle kimyasal yapılarına (yani fenolik halkaların ve eşlik eden grupların sayısına) bağlı olarak genellikle flavonoidler ve flavonoid olmayanlar (Şekil 9) olarak sınıflandırılmaktadır (143).



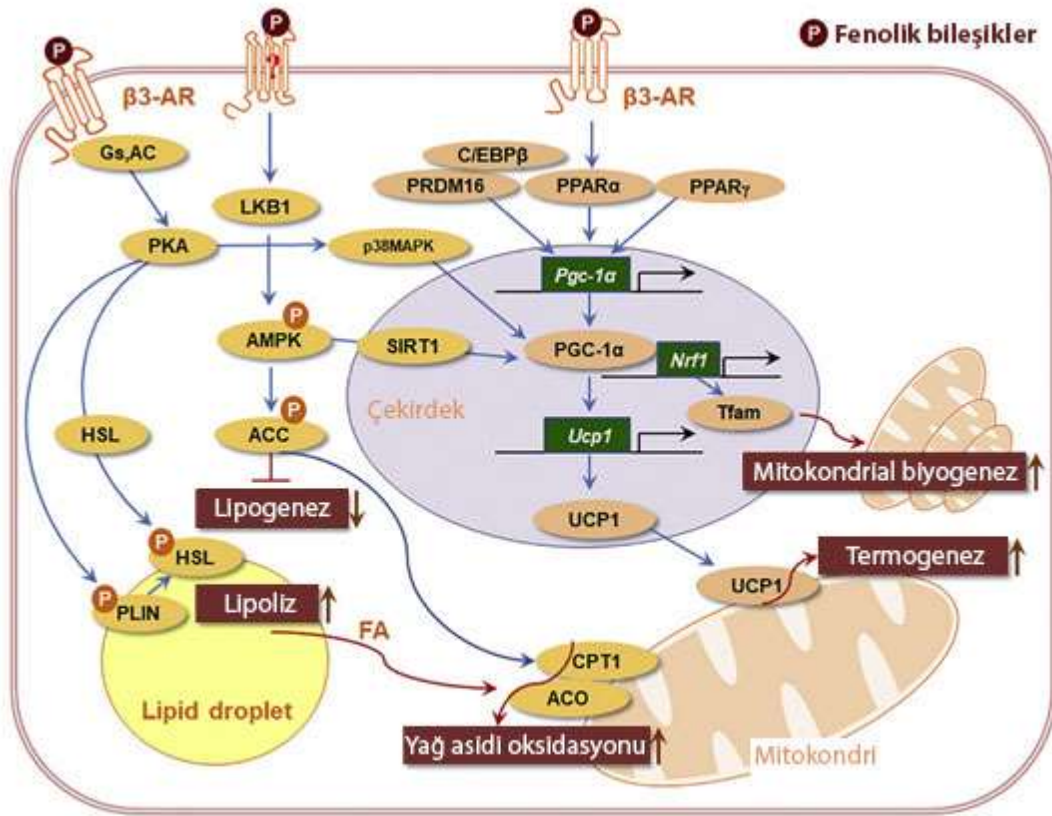
**Şekil 9.** Polifenollerin sınıflandırılması.

(143) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

Polifenollerin sağlığın korunması, hastalıkların önlenmesi ve/veya tedavisi konusundaki etkileri emilimlerine, dağılımlarına, metabolizmalarına ve eliminasyonlarına bağlıdır. Polifenollerin kimyasal yapısı, plazma ve dokularda bulunan metabolitlerin doğasının yanı sıra, emilim oranlarını ve kapsamını da belirler. Polifenoller bitkilerde aglikanlar, glikozitler, esterler veya polimerler olarak bulunur (144). Aglikanlar ince bağırsaktan emilebilirken glikozitler, esterler ve polimerler, emilmeden önce bağırsak enzimleri veya kolon mikroflorası tarafından hidrolize edilmelidir. Belirli kimyasal özellikler, örneğin moleküler ağırlık, lipofiliklik, stereokimya ve hidrojen bağı yapabilen bir grubun varlığı, polifenollerin bağırsak lümeninden sitozol enterositlerine taşınmasını ve geçirgenliğini etkilemektedir (144).

Yakın zamanda yapılan araştırmalar, bazı beslenme ajanlarının veya biyoaktif bileşiklerin termogenez indüksiyonu yoluyla obezite oluşumunu engelleyici, oluşan obeziteyi tedavi edici ve obeziteye bağlı gelişebilen diğer hastalıkları önleyici etkiler uygulayabildiğini göstermiştir. En çok çalışılan bileşiklerden bazıları da polifenollerdir (145).

In vitro ve in vivo çalışmalar dikkate alındığında, polifenollerin kilo kaybında rol oynayabileceği mekanizmalar:  $\beta$ -oksidasyon surelerinin aktivasyonu; tokluk indüksiyonu; enerji harcamasının uyarılması; adipositlerin farklılaşmasının engellenmesi; adiposit apoptozunun uyarılması, lipoliz artışı ve lipid metabolizması bozukluğunun iyileştirilmesi şeklinde olmaktadır (143) (şekil 10).



**şekil 10.** Polifenollerin termogenez, lipid metabolizması ve mitokondriyal biyogenez üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi.

(140) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

Termogenik potansiyele sahip diyet bileşiklerinden en çok çalışılan üzüm, çilek, yer fıstığı ve bazı çaylarda bulunan bir polifenol olan Resveratrol (RSV) AMPK fosforilasyonu ile bej fenotipin elde edilmesini yani BYD'ın esmerleşmesini indüklediği hem in vivo (146,147) hem de in vitro çalışmalarda bildirilmiştir. Altta yatan mekanizma, SIRT1'in aktivasyonunu içermektedir; PPAR $\gamma$ 'nın doğrudan deasetilasyonu yolu ve PRDM16 ile, BAT için tipik genlerin indüksiyonuna neden olur ve ayrıca 3T3-L1 preadipositlerinde WAT'a özgü genleri downregüle eder (148). Dahası, farklılaşmış inguinal BYD türevi stromal vasküler hücrelerin hücre kültürü ortamına RSV eklenmesinin, kahverengi ve bej adiposit belirteçlerinin ekspresyonunu önemli ölçüde artırmış olduğu bildirilmiştir. RSV'nin bej adiposit oluşumu üzerindeki bu etkisi, kısmen AMPK'nin fosforilasyonundan kaynaklanmaktadır, AMPK inhibisyonu yapıldığında RSV'nin BYD üzerindeki kahverengileşme etkileri yok olmuştur (147).

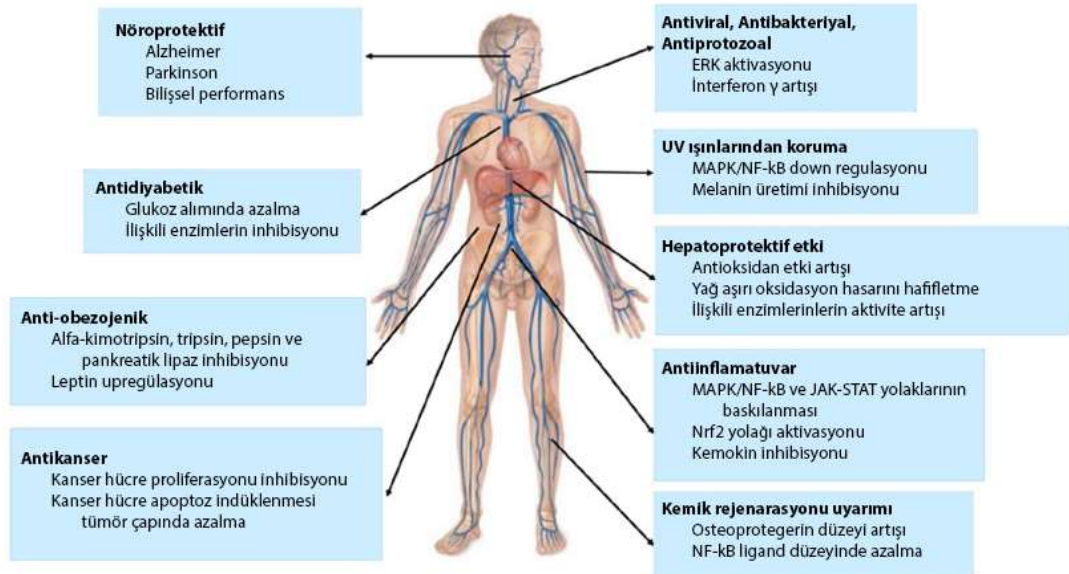
3T3-L1 hücre hattı ve fare primer beyaz adipositlerinde BYD'de kahverengileşme etkisi araştırılan bir diğer polifenol Kurkumin'in; UCP-1, PGC-1 $\alpha$  ve PRDM16 gibi kahverengiye özgü belirteçlerin upregülasyonuna neden olduğu ve AMPK aktivasyonunu içeren bir mekanizma yoluyla da bu hücrelerdeki lipidleri azalttığı gösterilmiştir (149). Dahası, kurkumin mitokondri sayısını ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda anahtar rol oynayan karnitin palmitoiltransferaz I (CPT1) ve sitokrom C gibi kritik mitokondriyal proteinlerin ekspresyonunu arttırmıştır. Bu nedenle, kurkuminin anti-obezite etkilerinin, hem lipogenezi inhibe etme hem de termogenezi indüksiyonu ve kahverengileşme (149) üzerine dayanmaktadır. Sıçanların inguinal BYD'sinden elde edilen beyaz adiposit hücreler kültüre edilip kurkumin ile muamele edilince; uyarılan hormona duyarlı lipazın kahverengiye özgü belirteçlerle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (150).

Kekik türlerinden elde edilen uçucu yağlarda bulunan bir monoterpen olan Timol ile yapılan bir çalışmada ise PGC-1 $\alpha$ , PRDM16 ve UCP-1 genlerinin ekspresyonunun önemli ölçüde arttırdığı,  $\beta$ 3-AR, PKA ve p38/mitojen ile aktive edilen protein kinazı (MAPK) aktive ederek beyaz adipositleri bej adipositlere dönüştürdüğü gösterilmiştir (151). Aynı zamanda polifenol tedavisinin, lipogenezi azalttığı ve Tfam, PGC-1 $\alpha$ , UCP1 ve PRDM16 ekspresyonu ile indüklenen mitokondriyal biyogenezi ve

HSL, perilipin, CPT1 ve açıl-koenzim A oksidaz (ACO) ekspresyonunu artırarak lipolizi uyardığı bildirilmiştir (151).

### Feniletanoid Glikozitler (PhG'ler)

Feniletanoid glikozitler (PhG'ler), bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan ve çoğu şifalı bitkilerden izole edilen suda çözünür doğal bileşiklerdir (152). Yapısal olarak, sırasıyla ester ve glikozidik bağlantılar yoluyla bir beta-glikopiranoza bağlanan sinamik asit ve hidroksifeniletıl kısımları ile karakterize edilirler. Ramnoz, ksiloz, apioz vb. de çoğu durumda molekülün çekirdeğini oluşturan glikoz kalıntısına bağlanabilmektedir (153). PhG'lerin hücre ve hayvan modellerinde çeşitli biyoaktivitelere sahip oldukları bildirilmiştir (152).



Şekil 11. PhG'lerin potansiyel sağlık yararları.

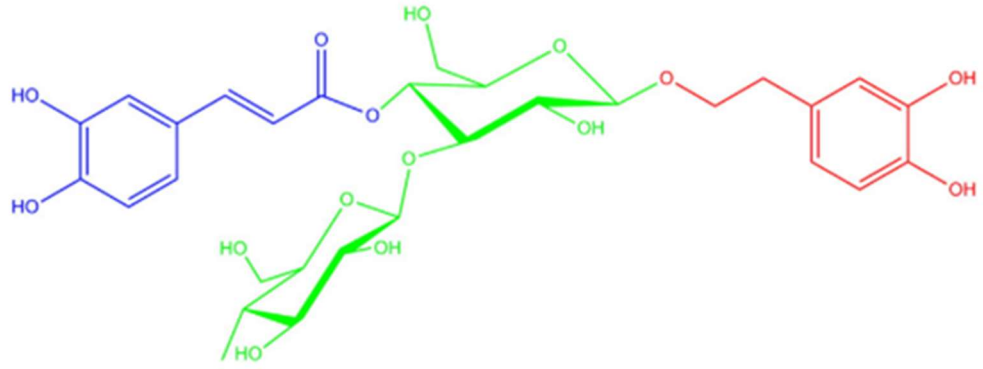
(152) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

## Verbascoside

*Verbascoside* (VB), kardiyovasküler etkiler de dahil olmak üzere geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi sayesinde, tıbbi bir bitki olarak da kullanılan fenolik asit alt sınıfına ait bir polifenoldür (153,154).

Feniletanoidlerin alt grubundan bir polifenol olan VB, Bignoniaceae, Buddlejaceae, Gesneriaceae, Labiatae, Oleaceae, Orobanchaceae, Scrophulariaceae ve Verbenaceae'ye ait birçok bitkide oluşan doğal bir birleşik olarak bilinmektedir (155).

VB, yapısal olarak sırasıyla ester ve glikozidik bağlar yoluyla bir  $\beta$  - (d) - glukopiranoside bağlanan kafeik asit grubu ve 4,5-hidroksifeniletanol (hidroksitirosol) ile glikoz molekülüne bağlı ramnoz (1– 3) ile karakterize edilmektedir (139).



**Şekil 12.** *Verbascoside*'in kimyasal yapısı.

A-ramnopiranozil--glukopiranoza (yeşil renkte) bağlanan feniletanoid (kırmızı) ve kafeik asit (mavi) kısımları. (156) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

İlk olarak 1963 yılında *Verbascum sinuatum*'dan (Scrophulariaceae) izole edilmiştir (157). Ancak yapısı o zaman belirlenemeyen VB; 1968'de (158) *Syringa vulgaris*'ten (Oleaceae) tekrar izole edilerek yapısı tespit edilmiş ancak *acteoside* olarak adlandırılmıştır. 1982'de Andary ve ark. (159) VB ve *Acteoside*'in yapılarının özdeş olduğunu bulmuşlardır. Bir yıl sonra *Kusagin*in *Clerodendron tricholomum*'dan (Verbenaceae) izole edilmiş ve daha sonra VB (*Acteoside*) ile özdeş olduğu

gösterilmiştir (160). Sonuç olarak günümüzde bileşik için her 3 adlandırma da kullanılmaktadır (156).

Literatürde PhG'lerin yağ doku ve obezite üzerine etkilerinin araştırıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır. VB sinonimi olan *Acteoside Ligustrum purpurascens* (kudingcha çayı)'da en bol bulunan ve en önemli aktif bileşen olarak bilinmekte olup; bu bitkinin ekstraktından elde edilen *Acteoside*'in pankreatik lipaz aktivitesini azaltarak yağ emiliminin azalmasına neden olduğu bu şekilde obezite karşıtı etki ettiği gösterilmiştir (161).

VB, *Lippia citriodora* (*Lemon verbena*) (LC) yapraklarında en bol bulunan bileşiktir ve bu nedenle biyolojik etkiler esas olarak bu fitokimyasal maddeye atfedilmektedir (162).

LC ekstraktının ve LC yapraklarından elde edilen VB'nin insülin dirençli hipertrofik adipoz hücrelerde, AMPK'ya bağlı mekanizmalar aracılığıyla yüksek glukoz kaynaklı metabolik stresi azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (14). Hem olgun hem de hipertrofik 3T3-L1 adipositlerine artan dozlarla uygulanan VB'nin TG akümülyasyonunu doz bağımlı olarak azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca AMPK aktivasyonu, PPAR $\alpha$  upregülasyonu ve yağ asidi sentaz (FASN) downregülasyonu sağlayarak obezitede YA oksidasyonunu arttırarak lipogenez baskıladığı gösterilmiştir (14). Aynı çalışmada ve LDL reseptör eksik (LDLr $^{-/-}$ ) hiperlipidemik farelerde de LC ekstraktı verilmesi sonucu, ekstrakt verilen grupta kilo alımı yiyecek alımı benzer olmasına rağmen kontrol grubuna göre azalmış ve lipid metabolizmasında; serum TG, kolesterol düzeyleri ve karaciğer yağlanmasını azaltarak obezite üzerine faydalı etkileri olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmanın akabinde LC ekstresinde bulunan farklı bileşiklerin tüm ekstraktın AMPK aktivasyon kapasitesine katkıları da araştırılmış, ekstraktaki 3 bileşiğin VB, luteolin-7-diglucuronide ve loganik asitin, kontrole göre AMPK fosforilasyonunu sırasıyla % 35.8, % 26.2 ve % 29.6'ya kadar arttırarak yüksek AMPK aktivasyon kapasitesini gösterdiği ve direk AMPK agonisti olarak etki ettiği bildirilmiştir (163).

LC ve *Hibiscus flower (Hibiscus sabdariffa L.)*(HS) ve ekstraktlarının bir kombinasyonu olan *Metabolaïd®* (MetA) formülünün, yüksek yağlı diyet (HFD) kaynaklı obez farelerdeki etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada ise; LC'nin vücut büyüklüğü, vücut ağırlığını ve kilo alımı önemli ölçüde azalttığı, epididimal BYD, retroperitoneal BYD ve total BYD ağırlığında azalmaya neden olduğu, adiposit büyüklüğünü ve lipid akümülyasyonunu azalttığı bildirilmiştir (164). Ayrıca aynı çalışmada LC'nin adipogenez ilişkili genler olan PPAR $\gamma$ , sterol düzenleyici eleman bağlayıcı transkripsiyon faktör 1c (SREBP1c), FASN mRNA ekspresyonu üzerine HFD ile beslenen gruba göre anlamlı etkisinin olmadığı ancak UCP-1 mRNA ekspresyonunu scBYD'da arttırdığı gösterilmiştir (164).

VB'nin tavşanlarda kan parametreleri, plazma oksidan / antioksidan durumu ve kalp ve karaciğer dokularındaki SIRT1 aktivitesi üzerine etkileri incelenmiş, VB kıyaslanan diğer bitki ekstraktlarına ( *Raphanus sativus* ekstarktı ve Lycopene ) göre lipit profilinde olumlu etki göstermiştir (165). Dahası, VB glisemik seviyelerde en yüksek azalmaya neden olmuştur ve oksidatif parametreleri azalttığı gibi, antioksidan aktiviteyi, vitamin A ve E seviyelerini arttırmıştır. Ayrıca antioksidan genleri düzenleyebilen, obezite ve metabolik bozukluklarla ilişkili AMPK aktivasyonu gibi birçok sinyal yolunun önemli bir düzenleyicisi olan SIRT1 aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (165).

### **Amaç ve Hipotezler**

Projemizin amacı 3T3-L1 adiposit hücrelerinde *Verbascoside*'ın adiposit kahverengileşmesi üzerine olası etkilerini incelemektir.

Bu amaç doğrultusunda ön hipotezlerimiz;

1. VB; lipid metabolizması, karbonhidrat metabolizması ve adiposit kahverengileşmesi ile ilgili genlerde ekspresyon düzeylerini modifiye eder.
2. VB, adipositlerde kahverengileşmeyi UCP-1 'i arttırarak uyarır.
3. PPAR $\gamma$  ile kahverengileşmede rol alan ortak transkripsiyon faktörleri olan PGC-1 $\alpha$ , PRDM16 'yı arttırarak UCP-1 oluşumunu uyarır.

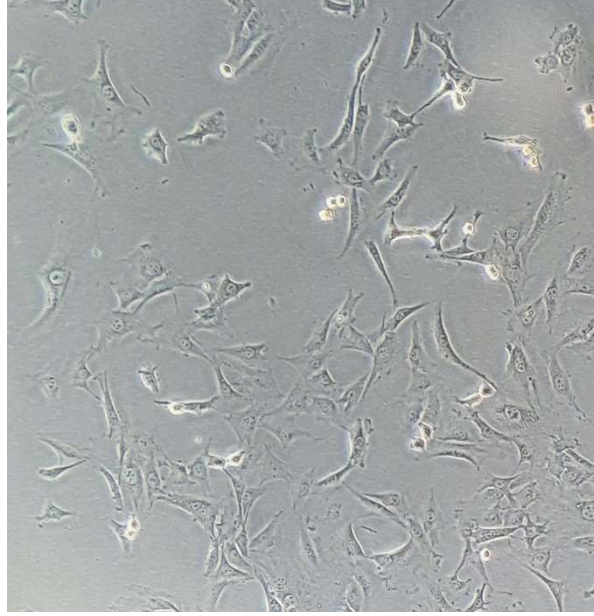


4. Ayrıca hücreyel lipogenez, lipit homeostazı ve adiposit farklılaşması ile ilgili başka bir transkripsiyon faktörü olan sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein-1 (SREBP1)'i arttırır.
5. YA oksidasyonununda rol alan karnitin palmitoiltransferaz-1 (CPT1) ve HSL enzimlerini arttırarak lipid akümülyasyonunu azaltır.
6. Adipositlerde NAD bağımlı deasetilaz olan SIRT1 aktivitesinde artışa neden olarak PPAR $\gamma$  deasetilasyonu ile kahverengileşmeyi uyarır.
7. Bej adiposit yüzey belirteci olan CD137, polifenol muamelesi sonrası kahverengileşmeyle orantılı olarak artar.
8. Mitokondriyal biyogenez belirteci olan mitokondriyal transkripsiyon faktör A (Tfam) 'ı arttırır ve adiposit kahverengileşmesini destekler.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 3T3-L1 HÜCRE DİZİNİ

3T3-L1 hücre dizisi (Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan- ATCC® CL173™) Mus musculus, fare embriyosundan elde edilmiş fibroblast hücre hattıdır (166). Hücrelerin morfolojisi de fibroblast şeklinde ince, uzun ve iğsi yapıdadır. Büyüme özellikleri bakımından zemine yapışık (adherent) olarak çoğalırlar. Aynı zamanda preadiposit olarak da bilinmektedir.



Şekil 13. 3T3-L1 hücre dizisi mikroskopik görünümü.

### HÜCRE KÜLTÜRÜ

#### Kullanılan Kimyasallar

1. DMEM Medium High Glukoz +4,5 g/L-DGlucose(-) pyruvate, GIBCO
2. DMEM Medium Low Glukoz + 1 g/L D- Glucose+ pyruvate, GIBCO
3. İnsülin (100 mg) SIGMA I6634

4. Dexametazon (100 mg) SIGMA D4902
5. 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) SIGMA I5879
6. Fetal bovine serum BLOWEST
7. Penisilin- Streptomisin WISENT
8. Tripsin EDTA (1X) (%0.25) WISENT
9. Calf serum (Heat Inaktivated) CEGROGEN
10. Verbascoside SIGMA CAS No: 61276-17-3
11. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) CHEMCRUZ
12. Hydrochloric acid fuming 37% (HCl)

### ***Tam Besi Yeri Hazırlanması***

Hücrelerin dondurulma, çözündürülme ve deneyler için çoğaltma işlemlerinde kullanılan besi yeridir. Hücrelerin farklılaşma öncesi aşamalarında kullanıldı. Tam besi yeri (TB) hazırlanması için düşük glukoz (1 g/L) içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle mediumu (DMEM) içeren ortama, %10 Calf Serum (CS), %1 100 U/ml penisilin, 100 µg/mL streptomisin (P/S) solüsyonu eklendi.

Hücrelerin büyümesi aşamasında en çok kullanılan besi yeri olduğu için çalışma öncesi 500 ml hacimde hazırlandı. Hazırlarken 500 ml tam dolu şişeden 50 ml atıldı. Üstüne 50 ml CS, 5 ml P/S solüsyonu eklendi.

### **Hücrelerin İlk Çözündürülmesi**

ATCC'den temin edilen vialin çözündürülmesi için önerilen protokol uygulandı. Öncelikle -80°C'de donmuş halde bulunan kriyotüp çıkarılarak 37°C su banyosunda hafifçe çalkalanarak çözündürüldü. İçeriği çözülür çözülmez kriyotüp su banyosundan çıkarıldı ve %70 etanol püskürterek dekontamine edildi. Bu noktadan itibaren tüm deneyler katı aseptik koşullar altında gerçekleştirildi. Vial içeriği (9.0 mL) TB içeren bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve 7 dakika boyunca 125 x g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantı atılarak hücre pelleti önceden hazırlanan TB ile yeniden süspanse edilerek ve T25 2 adet flaska dağıtıldı. Flasklar %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde (Nüve, EC 160) 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün hücre ortamı 5 ml taze besiyeri ile değiştirildi.

## Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması

Hücreler 2 günde bir besi yeri değiştirilerek takip edildi ve %70 konfluent olduktan sonra deneylerde kullanılmak üzere çoğaltıldı. T75'lik flasklarda pasajlama işlemi için;

1. Flaskta mevcut halde bulunan TB çekildi ve 5 ml PBS ile 1 kez yıkandı ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı.
2. Flaska damla damla 2 ml tripsin (%0,25) eklenerek flaksın her tarafını kaplaması sağlandı. Ardından tripsinizasyon işleminin gerçekleşmesi için 2 dk inkübatörde bekletildi.
3. 2 dk süre bitiminde flaskın kenarına nazikçe vurulup kalan hücrelerin de zeminden uzaklaştırılması sağlandı ve invert mikroskopta (Olympus, CKX41SF Ters Faz Kontrast Mikroskobu) değerlendirilerek hücrelerin yüzdüğü teyit edildi.
4. Tripsin aktivasyonunu durdurmak için 10 ml TB yine damla damla flaska eklendikten sonra flask içeriği nazikçe tüm alt duvarı yıkayacak şekilde birkaç kez pipetaj yapıldı.
5. Bu aşamadaki 12 ml toplam hacimdeki içerikten 0,5 ml hücre sayımı için steril bir ependorfa alındı. Ardından hücre sayımına geçildi.

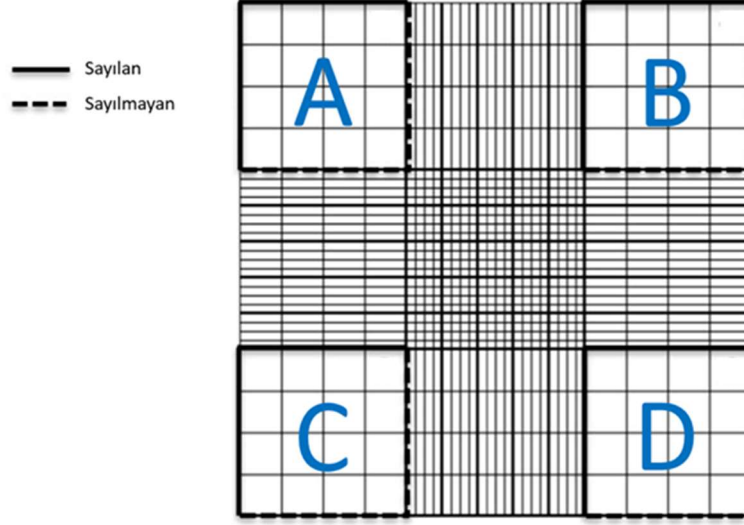
## Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımı yukarıda anlatılan şekilde tripsinize edilip daha sonra nötralize edilen flasktan yapıldı. Flask içerisinde homojenize edilen medium ve hücre karışımından 0,5 ml bir ependorfa alınarak sayım işlemine geçildi.

Hücre sayımı bu ependorftan 10 µL pipetaj ile alınarak Neubauer lamında yapıldı. Şekil 14'te gösterildiği gibi Neubauer lamında harflerle belirtilen karelerin hacmi 1 mm<sup>3</sup> tür. Bu dört alandaki sayıma karelerin sol ve üst kenarlarının üzerindeki hücreler dahil edildi.

Tüm bu alanlardaki hücreler (N) sayıldı.  $N = A + B + C + D$

1 mm<sup>3</sup> teki hücre sayısı =  $(N/4) \times 10^4$  formülüne göre hesaplandı.



Şekil 14. Neubauer lamı.

### Hücrelerin Pasajlanması

1. Ekim için yeterli yoğunlukta hücre elde edilemediği durumlarda pasajlama yapıldı. Bunun için 3 adet yeni T75 flaska 8'er ml TB üzerine de 4'er ml hücre içeriği eklendi.
2. Hücreler, 37°C'de, %95 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> varlığında, TB içinde inkübe edildi.
3. Pasajlamanın ertesi günü hücre ortamları çekilerek 12 ml yeni TB ile değiştirildi. Hücrelerin 2-3 günde bir besi yeri değiştirilerek flaskı kaplaması sağlandı.

### Hücrelerin Dondurulması

Daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı stoklandı. Bunun için başlangıçtaki basamaklar hücrelerin pasajlanması işlemleri ile aynı olmak üzere;

1. T75 flaskta %70-80 konfluent olduktan sonra hücrelerin üzerindeki besi yeri çekildi ve 5 ml PBS flaskın duvarından yavaşça verilerek flaskın tüm yüzeyini kaplaması sağlanarak yıkama işlemi yapıldı ve PBS geri çekildi.
2. T75 flask için 2 ml tripsin damla damla eklenerek hücreler kaldırıldı. Flask 2 dk boyunca inkübatörde bekletildi.
3. İşlem sonunda zemine yapışık hücre kalmadığı invert mikroskopla gözlemlendikten sonra 10 ml taze TB eklendi ve enzim aktivasyonu durduruldu.
4. Hücreleri dondurmak için de hücre sayımı yapıldı. Dondurmak için hedeflenen hücre sayısı 500.000-1.000.000 arası olarak kabul edildi. Hücre sayımı daha önce belirtildiği şekilde yapıldı.
5. Sayım sonucu alanda  $20+9+17+15 = 61$  adet hücre sayıldı.  
 $61/4=15,25$  Ortalaması yaklaşık 15 kabul edilerek;  
 $N=15 \times 10^4 = 150000$  hücre/ml olarak bulundu.
6. 1 ml'de 150.000 hücre olarak oran orantı ile  
12 ml'de toplam 1.800.000 hücre olarak hesaplandı.  
Her bir kriyotüpte 600.000 hücre dondurulmak üzere planlandı.
7. Flask içeriği (hücreler, tripsin ve medium) toplam 12 ml, 3 ayrı santrifüj tüpüne 4'er ml dağıtılıp üzerlerine 8 ml TB eklendi.
8. Tüpler 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
9. Bu sırada 3 adet kriyotüpe %5 DMSO içeren hücre dondurma çözeltisi hazırlandı. Bunun için 50 µl DMSO ve 450 µl TB ile kriyotüplere eklendi.
10. Santrifüj sonrası tüplerin üstünde kalan süpernatant atıldı, altta kalan pellet üzerine her bir santrifüj tüpüne 500 µl TB eklenerek resüspanse edildi.
11. Hücre süspansiyonları, kriyotüplere dağıtıldı (Her bir kriyotüp toplam 1 ml oldu).
12. Kademeli dondurma yapmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı (*freezing container*) içinde en az 4 saat  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de tutularak daha sonra  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmak üzere kaldırıldı.

### **Hücrelerin Çözdürülmesi**

Dondurulan bu hücreler deneylerde kullanılmak üzere hücreye ihtiyaç olduğunda çözdürüldü.

1. Hücreleri içeren vial 37°C su banyosunda hafifçe sallanarak çözülüp kontaminasyon olasılığını azaltmak için suyun yüzeyinde tutularak çözülme işlemi hızlı bir şekilde yapıldı.
2. İçeriği çözülür çözülmez vial su banyosundan uzaklaştırılıp %70'lik alkolle temizlendi.
3. Temiz bir santrifüj tüpüne 6 ml TB eklenerek eriyen vial içeriği tüpe boşaltıldı.
4. 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı.
5. Hücre içeren pellet 1 ml mediumla tekrar resüspanse edildi.
6. Bu sırada 1 adet T75 flaska 11 ml TB eklendi. Üzerine resüspanse edilen pellet eklenerek hücre çözdürülmesi tamamlandı.

### **Preadiposit Hücrelerinin Farklılaştırılması**

3T3-L1 preadiposit hücreleri deneylerde kullanılmak üzere bir dizi işleme tabi tutularak farklılaştırıldı. Bunun için belirli günlerde 3 farklı besi yeri ile muamele edildi. Deneylere başlamadan önce bu besi yerlerinde kullanılacak kimyasalların stokları hazırlandı. Ardından besi yeri hazırlanarak farklılaştırma protokolüne geçildi.

### **Stokların Hazırlanması**

Bütün stoklarda kullanılan distile su otoklavlandı ve 0,22 µm filtreden geçirilerek hazırlandı.

### ***Deksametazon***

100 mg toz halde bulunan preperatın molekül ağırlığı 392,46 g/mol dür. 0,5 mM (0,0005M) stok hazırlanması için hesaplama yapıldı.

30,57 ml distile su ile 6 mg DKSM çözdürüldü.

50 ml'lik falkona 30,57 ml distile su eklendi, üzerine 6 mg tarttığımız DKSM ilave edildi ve bu iki karışım vorteks ile karıştırıldı. 1'er ml şeklinde ependorflara dağıtılıp aliquote olarak -20°C'ye kaldırıldı.

### ***3-İzobutil-1-Metilksantin***

100 mg toz halde bulunan preperatın molekül ağırlığı 222,24 g/mol dır. 10 mM (0,01M) stok hazırlanması için hesaplama yapıldı.

50 ml'lik falkona 14,85 ml distile su üzerine 33 mg tarttığımız IBMX ilave edildi. Karışımın vortekslenerek tam olarak çözülmesi sağlandı. Ardından oluşan beyaz bulanık renkte sıvının erimesi için küçük bir behere su doldurup kaynamış suda 10-15 dk bekletilerek şeffaf hale gelmesi sağlandı ve 0,22 µm çaplı filtre ile süzülerek 6'şar ml şeklinde 15 ml'lik falkonlara aliquote edilip -20 °C'ye kaldırıldı.

### ***İnsülin***

100 mg toz halde bulunan preperatın molekül ağırlığı 5733,49 g/mol dır. Stok 1 mg/ml olacak şekilde hesaplama yapıldı.

50 ml'lik falkona 20 ml distile su üzerine hidroklorik asit (HCl) 22 µL eklendi. 20 mg (0,020 gr) tartılan INS ilave edildi ve bu üçünün karışımını vortekslendi. Ardından karışım 0,22 µm çapındaki filtreden geçirilerek filtre edilip 6'şar ml şeklinde 15 ml'lik falkonlara alındı, aliquote edilip -20° C'ye kaldırıldı.

## **Farklılaştırma Mediumlarının Hazırlanması**

### ***Medium 1 (MD 1)***

Adiposit farklılaşmasının indüklenmesi için kullanılacak besi yeridir. Bunun için total hacim deneylerde kullanılacak kültür kabı hacmine göre hesaplanıp taze olarak hazırlanmak üzere; yüksek glukoz (4,5 g/L) içeren DMEM içerisine 0.5 mM IBMX, 1 µM DKSM, 10µg/ml INS, %10 Fetal sığır serumu (FBS), %1 P/S solüsyonu eklenerek hazırlandı. Bu maddeler medium içerisinde çözündürülüp daha sonra filtrelenerek deneylerde kullanıldı.



### **Medium 2 (MD 2)**

Adiposit hipertrofinin sağlanması için kullanılacak besi yeridir. Bunun için de yüksek glukoz (4,5 g/L) içeren DMEM içerisine 10µg/ml INS, %10 Fetal sığır serumu (FBS), %1 P/S solüsyonu eklenerek hazırlandı. Hücrelerin farklılaşması sonrası takibinde kullanılan bu besi yeri de çalışma öncesi 500 ml hazırlandı (Tablo 3).

Toplam hacim 500 ml olacak şekilde

- İnsülin için 1 mg/ml (1000 µg/ml) stoktan, 10 µg/ml konsantrasyonda gerekli miktar için

$C1 \times V1 = C2 \times V2$  formülü kullanılarak

$$1000 \times V1 = 10 \times 500$$

$$V1 = 5\text{ml}$$

- FBS %10 içermesi için  $500 \times 0,1 = 50$  ml
- P/S %1 içermesi için  $500 \times 0,01 = 5$  ml

**Tablo 3.** MD 2 içeriği.

<b>Medium İçeriği</b>	<b>Konsantrasyon</b>	<b>Stok</b>	<b>Son Hacim</b>
INS	10 µg/ml	1 mg/ml	5 ml
FBS	%10		50 ml
P/S	%1		5 ml
DMEM (high glukoz)	-		440 ml
			500 ml

- Hesaplanan miktarlar toplandıktan sonra 500 ml dolu DMEM (yüksek glukozlu) içerisinden 60 ml çekilip atıldı ve üzerine bulunan hacimlerde INS, FBS, P/S solüsyonu ilave edildi.

### ***Medium 3 (MD 3)***

MD2 aynı zamanda deneyin son bölümünde polifenol uygulanması aşamasında da kullanıldı bu aşamada ise içeriğinde yalnızca %2 FBS olarak değiştirildi (Tablo 4).

**Tablo 4.** MD 3 içeriği.

<b>Medium İçeriği</b>	<b>Konsantrasyon</b>	<b>Stok</b>	<b>Son Hacim</b>
INS	10 µg/ml	1 mg/ml	5 ml
FBS	%2		50 ml
P/S	%1		5 ml
DMEM (high glukoz)	-		440 ml
			500 ml

### ***Test Ortamı Hazırlanması***

Deneylerde kullanılacak mediumların hazırlanmasında kullanılan malzemelerden kaynaklanabilecek üremelerin test edilmesi amacıyla deneylerde kullanılmadan önce hazırladığımız TB ve MD2 içeren 2 adet flask hazırlandı. Bunun için T25 2 adet flaska 2 ml TB + 6 ml MD2 eklendi ve 3 gün boyunca hem mikroskopik hem de makroskopik olarak herhangi bir üreme olup olmadığı kontrol edildi.

### ***Verbascoside Hazırlanması***

10mg VB (sigma) içine 160,1 µL DMSO eklenerek çözdürüldü. 10 mg preperatın tamamı ile 100 mM stok oluşturuldu. Oluşturulan stok yeniden çözdürülüp dondurma işleminden korunması için alikvatlanarak -20° C'ye kaldırıldı.

### **Deney Grupları**

1. Preadipositten adiposite farklılaştırılıp daha sonra hipertrofik adiposit hale getirilen hücreler (Kontrol)
2. Hipertrofik hale getirilip 18. gün 48 saat süreyle 50 µM *Verbascoside* ile inkübe edilen hücreler (V50)

3. Hipertrofik hale getirilip 18. gün 48 saat süreyle 100 µM *Verbascoside* ile inkübe edilen hücreler (V100)

### **Hücrelerin Deneyler İçin Ekilmesi**

Hücreler -80°C'den daha önce tarif edildiği şekilde çıkarılarak çözdürüldü ve kriyotüp içeriği T75 kültür kabına ekildi. Öncelikle flask içerisinde yaklaşık 5-6 gün; TB ile her iki günde bir ortamları yenisi ile değiştirilerek takip edildi. Ekilen kültür kaplarının yüzeyinin %70-80'ini kaplayana kadar çoğalmaları beklendi.

Deneylerde kullanılacak hücrelerin aynı pasaj, aynı kökenden olmaları için daha önceden aynı pasajdan çoğaltılan 3 adet flasttaki hücrelerin her biri üzerindeki besi yeri çekildi. Ardından 2 ml PBS ile yıkama işlemi yapıldı ve PBS aspiratör ile flaskın köşesinden yavaşça ortamdan uzaklaştırıldı. 2'şer ml tripsin ilavesinin ardından flastlar inkübatöre 2 dk süreyle kaldırıldı. Mikroskopta kalktığı gözlemlenen hücrelerin üzerine 10 ml TB eklenerek nötralize edildi. Ardından sayım işlemine geçildi. Örnek hesaplama;

#### 1. Flask için

$$8 + 29 + 23 + 16 = 76 \text{ adet hücre sayıldı.}$$

$$76 / 4 = 19$$

#### 2. Flask için

$$24 + 33 + 19 + 10 = 86 \text{ adet hücre sayıldı.}$$

$$86 / 4 = 21,5$$

#### 3. Flask için

$$15 + 31 + 13 + 22 = 81 \text{ adet hücre sayıldı.}$$

$$81 / 4 = 20,25$$

3 flaskın ortalaması 20 kabul edildi.

$$N = 20 \times 10^4 = 200.000 \text{ hücre/ml olarak hesaplandı.}$$

3 adet flaskın toplam içeriği (tripsin ve TB toplamı 36 ml); hücre içeriğinin homojen olması için tek bir falkona toplandı. Bu falkondaki toplam hücre miktarı 1 ml'de 200.000, 36 ml'de toplam 64.000.000 hücre olarak hesaplandı.

Bu miktarın hem flasklara hem de Oil Red O boyama için 6 kuyulu plakalara ekim için yeterli sayıda olduğu görüldü.

Mikrodizin analiz için gerekli total RNA miktarına büyük hacimli kültür kabı gerekli olması nedeniyle deneylerin T75 flasklarda yapılması uygun görüldü. Ekim işlemleri deney gruplarına uygun sayıda olan 3 adet flaska yapıldı. Ardından flasklara ekim için planlanan 500.000 hücre için hesaplama yapıldı.

Falkondaki hücre içeriğinden pipetaj yapılarak 2,5 ml ayrı bir falkona alındı ve üzerine 9,5 ml TB eklenerek toplam 12 ml'ye tamamlandı. Bu miktarın tamamı otomatik pipete çekilerek flaskın periferinden merkeze olacak şekilde damla damla eklendi. Bu işlem 3 flask için de aynı şekilde yapıldı.

Aynı zamanda bir diğer çalışma olan Oil Red O boyama içinse 6 kuyulu plakada her bir kuyuya 100.000 hücre ve toplam 2 ml olacak şekilde hesaplama yapıldı. 6 kuyulu plakaya ekim için ise her kuyuya 100.000 hücre olarak planlama yapıldı.

1 ml'de 200.000 hücre bulunduğundan 6 kuyulu plakanın tamamı için gerekli olan 600.000 hücre için, 3 ml hücre içeriği gerekli olarak hesaplandı. Her kuyuya 100.000 hücre için 0,5 ml ekim plandı. Falkondaki hücre içeriğinden pipetajla yeni bir falkona 3 ml alındı. Üzerine 9 ml TB eklenerek toplam 12 ml'ye tamamlandı. Miktarın tamamı otomatik pipete çekildi. Ekim esnasında otomatik pipet ucu kültür kabına dik tutularak ve hücrelerin kabın merkezinde toplanma eğilimi olduğundan dışarıdan içeriye doğru dairesel şekilde, her bir kuyuya 2 ml olmak üzere damla damla ekim yapıldı.

### **3T3-L1 Preadipositlerinin Farklılaştırılması**

Ekim yapılan hücreler, kültür kaplarında yeterli yoğunluğa ulaşmaları için 5 gün boyunca TB ile takip edildi.

Ekim sonrası 2. ve 4. günler flaskların mediumları ortamdandan uzaklaştırılıp her birine 12 ml yeni TB eklendi.

Aynı zamanda 6 kuyulu plakaya ekilen hücrelerin mediumları da aspiratörün ucu kültür kabının tabanına değmeyecek şekilde yavaşça çekilerek atıldı. Yerine her kuyu için 2 şer ml TB eklendi.

Hücrelerin büyümeleri mikroskopta takip edildi ve 5. gün %90 konfluent oldukları gözlemlendi.

Bu aşamada preadiposit olan hücrelerin adipositlere farklılaşması daha önce tanımlanmış protokol takip edilerek yapıldı (14,167). Ekim sonrası 5. gününde konfluent olan hücrelere adiposit farklılaşmasının indüklenmesi için MD 1 eklendi.

Bunun için gerekli MD1 hacmi hesaplandı. 2 adet 6 kuyulu plakada her bir kuyuya 2 ml olmak üzere toplam 24 ml ve 3 adet T75 flaska her birine 12 ml olmak üzere toplam 36 ml olarak hesaplandı. MD1 için gerekli toplam hacim  $24 + 36 = 60$  ml olarak belirlendi ancak hazırlandıktan sonra filtre edileceği için kayıplar göz önüne alınarak 65 ml hazırlandı.

MD1 hazırlanması

Toplam hacim 65 ml olacak şekilde;

- İnsülin için 1 mg/ml (1000 µg/ml) stoktan, 10 µg/ml konsantrasyonda gerekli miktar için,

$$C1 \times V1 = C2 \times V2 \text{ formülü kullanılarak}$$

$$1000 \times V1 = 10 \times 65$$

$$V1 = 0,65 \text{ ml} = 650 \mu\text{l}$$

- DKSM için 0,5 mM (500 µM) stoktan 1 µM konsantrasyonda gerekli miktar için,

$$C1 \times V1 = C2 \times V2 \text{ formülü kullanılarak}$$

$$500 \times V1 = 1 \times 65$$

$$V1 = 0,13 \text{ ml} = 130 \mu\text{l}$$

- IBMX için 10 mM stoktan 0,5 mM konsantrasyonda gerekli miktar için

$$C1 \times V1 = C2 \times V2 \text{ formülü kullanılarak}$$

$$10 \times V1 = 0,5 \times 65$$

$$V1 = 3,25 \text{ ml} = 3250 \mu\text{l}$$

- FBS %10 içermesi için  $65 \times 0,1 = 6,5 \text{ ml}$
- P/S %1 içermesi için  $65 \times 0,01 = 0,65 \text{ ml} = 650 \mu\text{l}$  hesaplandı.
- Hesaplanan miktarlar toplandıktan sonra kalan hacim DMEM (yüksek glukoz içeren) ile 65 ml'ye tamamlandı (Tablo 5)

**Tablo 5.** MD 1 içeriği.

Medium İçeriği	Konsantrasyon	Stok	Son Hacim
INS	10 $\mu\text{g/ml}$	1 mg/ml	650 $\mu\text{l}$
FBS	%10		6,5 ml
DKSM	1 $\mu\text{M}$	0,5mM	130 $\mu\text{l}$
IBMX	0,5 mM	10mM	3250 $\mu\text{l}$
P/S	%1		65 $\mu\text{L}$
DMEM (high glukoz)	-		53,82 ml
			65 ml

INS, DKSM, IBMX, FBS, P/S stokları  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak su banyosuna konuldu. Ardından hesaplanan hacimde DMEM steril bir kaba konulup üzerine eriyen stoklardan öncelikle pipetaj yapılarak hesaplanan miktarda içerik ilave edildi.

Hazırlanan MD1 enjektöre çekilerek 0,22  $\mu\text{M}$ 'lik filtreden geçirildi.

Flasklardaki TB uzaklaştırıldı, yerine hazırlanan MD1 flasklara 12 ml, 6 kuyulu plakalara 2'şer ml olarak dağıtıldı. Hücreler bu farklılaşma besi yerinin içerisine 2 gün (48 saat) bekletilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. MD1 eklendiği gün 1. gün kabul edildi. 48 saat sonunda hücrelerinden MD1 uzaklaştırıldı. Hücrelere daha önceden hazırlanan ve test ortamı ile üreme olmadığı teyit edilen MD2 besi yeri yine flasklara

12 ml ve 6 kuyulu plakalara 2 ml olarak eklendi. MD2 her 2 günde bir yenisi ile değiştirilerek takip edildi.

Bu aşamadan sonra hücreler 8 ila 10 gün sonunda olgun (mature) adiposit, 18 ila 21 gün sonrasında ise hipertrofik adiposit haline geldi (168).

Deneylerimiz 18. gün farklılaşmasını tamamlayan ve hipertrofik hale getirilmiş adipositlerde yapıldı.



Şekil 15. Farklılaştırma süreci şematik görünümü.

### **Verbascoside Uygulanması**

Uygulama için MD3 hazırlanması

Toplam hacim 48 ml olacak şekilde;

- İnsülin için 1 mg/ml (1000 µg/ml) stoktan, 10 µg/ml konsantrasyonda gerekli miktar için,

$C1 \times V1 = C2 \times V2$  formülü kullanılarak

$$1000 \times V1 = 10 \times 48$$

$$V1 = 0,48 \text{ ml} = 480 \text{ µl}$$

- FBS %2 içermesi için,  $48 \times 0,02 = 0,96 \text{ ml} = 960 \text{ µl}$
- P/S %1 içermesi için,  $48 \times 0,01 = 0,48 \text{ ml} = 480 \text{ µl}$  hesaplandı.

Hesaplanan miktarlar toplandıktan sonra kalan hacim DMEM (yüksek glukozlu) ile 48 ml'ye tamamlandı.

*Verbascode* 50-100 µM olmak üzere 2 farklı dozda hipertrofik 3T3-L1 hücrelerine uygulandı. Literatürde yer alan daha önceki çalışmalarla belirlenen süreler (48 saat) ve doz aralıkları esas alındı (14,163). Yüksek glikozla indüklenen hipertrofik adipositler üzerindeki farklı etkiler, ortama önceden belirlenmiş konsantrasyonlarda 48 saat boyunca VB eklenerek test edildi.

1. 18. gündeki hipertrofik adipositlere uygulanacak VB miktarları hesaplandı.
2. *Verbascode* ile daha önceden hazırlanan 100 mM stoktan 50 µM'lık konsantrasyonda deney grubu flask için son hacim 12 ml olacak şekilde,

$$100 \text{ mM} = 100.000 \text{ µM}$$

$$100.000 \text{ µM} \times V1 = 50 \text{ µM} \times 12 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,006 \text{ ml} = 6 \text{ µL}$$

12 ml MD2'den 6 µL atılarak 6 µL VB eklendi.

3. 100 µM'lık konsantrasyonda deney grubu flask için son hacim 12 ml olacak şekilde,

$$100 \text{ mM} = 100.000 \text{ µM}$$

$$100.000 \text{ µM} \times V2 = 100 \text{ µM} \times 12 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,012 \text{ ml} = 12 \text{ µL}$$



12 ml MD2'den 12 µL atılarak 12 µL VB eklendi.

4. 50 µM'lık konsantrasyonda deney grubu 6 kuyulu plaka için son hacim 3 ml olacak şekilde,

$$100 \text{ mM} = 100.000 \text{ µM}$$

$$100.000 \text{ µM} \times V1 = 50 \text{ µM} \times 3 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,0015 \text{ ml} = 1,5 \text{ µL}$$

3 ml MD2'den 1,5 µL atılarak 1,5 µL VB eklendi.

5. 100 µM'lık konsantrasyonda deney grubu 6 kuyulu plaka için son hacim 3 ml olacak şekilde,

$$100 \text{ mM} = 100.000 \text{ µM}$$

$$100.000 \text{ µM} \times V1 = 100 \text{ µM} \times 3 \text{ ml}$$

$$V1 = 0,003 \text{ ml} = 3 \text{ µL}$$

3 ml MD2'den 3 µL atılarak 3 µL VB eklendi.

6 kuyulu plakalarda örnekler duplike çalışıldı.

## **OİL RED O BOYAMA**

Deneylerimizde oluşturduğumuz hücre kültürü modelinin uygunluğunun test edilmesi amacıyla 2 aşama olarak gerçekleştirildi. Boyama kit (Oil Red O boyama kiti BİOVİSİON (K580-24)) kullanıldı.

Hücreler 6'lı kuyulu plakalara daha önce tarif edildiği gibi 100.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı. Adiposit farklılaştırma protokolünde tarif edilen basamaklar uygulanarak hücrelerin farklı aşamalarında Oil Red O boyaması yapıldı ve hücre içi lipit birikimi değerlendirildi.

Boyama aşamasında kültür kabı hücre kabini dışına çıkarılacağından devam eden günlerde boyanacak gruplar 3 farklı 6 kuyulu plakalara ekildi.

Boyamada kullanılan deney grupları;

1. Farklılaşma öncesi
2. Olgun adiposit (10. Gün)
3. Preadipositten adiposite farklılaştırılıp daha sonra hipertrofik adiposit hale getirilen hücreler (kontrol)
4. Hipertrofik hale getirilip 18. gün 48 saat süreyle 50  $\mu$ M *Verbascoside* ile inkübe edilen hücreler (V50)
5. Hipertrofik hale getirilip 18. gün 48 saat süreyle 100  $\mu$ M *Verbascoside* ile inkübe edilen hücreler (V100)

Miktarlar 6 kuyulu plakalarda 2 kuyu boyama yapılması için kit protokolüne uygun olarak hesaplandı.

1. Çalışma öncesi ilk olarak Oil Red O Stok Çözeltisi hazırlandı. Oil Red O 20 ml %100 izopropanol içinde çözüldü, iyice karıştırılıp ve 20 dakika bekletildi.
2. Ardından bir falkon içerisinde 2 birim suya 3 birim izopropanol (%100) eklenerek izopropanol (%60) hazırlandı. [6 ml distile su + 9 ml İzopropanol (%100)]
3. Hücreleri sabitlemek için öncelikle her bir kuyucuktaki besi yeri hücrelerden uzaklaştırılarak ve 2 kere PBS ile yavaşça yıkandı. Her kuyuya 2 ml formalin (%10) kuyucuğun kenarından eklendi ve 1 saat inkübe edildi.
4. Hücreleri boyama aşamasında ise öncelikle Oil red O Çalışma Solüsyonu hazırlandı. 2 birim distile su (dH<sub>2</sub>O)'ya, 3 birim Oil Red O Stok Çözeltisinden olmak üzere; 1600  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O + 2400  $\mu$ L Oil Red O Stok Çözeltisinden eklendi ve iyice karıştırılıp 10 dakika bekletildi ardından 0,2  $\mu$ m şırınga filtresi ile filtre edildi.
5. 1 saat inkübe edilen hücrelerin üzerindeki formalin çekilip atıldı ve hücreler 2 kez dH<sub>2</sub>O ile yavaşça yıkandı.
6. Her kuyuya hazırlanmış olan bu izopropanol (%60) eklenerek ve 5 dakika inkübe edildi.
7. 5 dk'nın sonunda izopropanol çekildi ve hücreleri tamamen ve eşit olarak kaplayacak şekilde 2'şer ml Oil red O çalışma solüsyonu eklendi. Plate hafifçe sağa/sola eğilerek solüsyonun kuyucuğun her tarafını kaplaması sağlandı ve 10 dakika inkübe edildi.

8. Ardından Oil Red O solüsyonu çekilip atıldı ve ortamda boya kalmayıncağa kadar 5 kez dH<sub>2</sub>O ile yıkandı.
9. 2 ml hematoksilen eklenerek 1 dakika inkübe edildi.
10. Süre sonunda hematoksilen çekildi ve 5 kez dH<sub>2</sub>O ile yıkandı.
11. Hücreler 10X ve 20X büyütme ile ışık mikroskopu altında görüntülenerek fotoğraflandı.

## **DENEYLERİN SONLANDIRILMASI**

### **RNA İzolasyonu**

18. gün VB uygulaması yapılan hipertrofik adipositler 48 saat sonunda (20. Gün) total RNA izole edilmek üzere Trizol (TRIZOL™ Reagent İNVİTROGEN- Thermo Fisher Scientific) ile toplandı. Bunun için protokole uygun olarak flaskların üzerindeki besi yeri uzaklaştırıldı. Her bir flastaki hücrelerin üzerine 1'er ml Trizol reaktifi eklendi ve hücre kazıyıcı ile flask tabanı kazındı. Hücrelerin flaskın bir kenarında toplanması sağlandı ve ardından pipet yardımıyla hücreler yeni bir ependorfa alındı. Daha saf bir RNA eldesi için ticari kit ile total RNA izolasyonu işlemine kadar örnekler -80°C'de saklandı.

### ***Total RNA İzolasyonu***

Total RNA, ticari kit kullanılarak (Hybrid-R, Gene All) izole edildi. Kit protokolüne uygun olarak;

1. Trizol ile toplanan hücre pelletleri -80°C'den alındı.
2. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Örnekler 4°C'de 12,000 xg 10dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant dikkatlice pipetle çekilip yeni bir ependorf tüpe alındı.
4. Ependorfların üzerine 1 ml trizol için 200 µl kloroform eklendi. 15 sn vortekslendi ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. 4°C'de 12,000 xg 15 dk santrifüj edildi. Sıvı faz yeni tüpleri alındı.
6. Örneklerin üzerine 1 ml RBI Buffer eklendi. İyice karıştırıldı.

7. Karışımın 700 µl'sini mini kolon F ye aktarıldı.
8. Oda sıcaklığında 10,000 xg 30 saniye santrifüj edildi.
9. Kalan karışım adım 8'deki gibi tekrar edildi.
10. Mini kolona 500 µl SWI Buffer eklendi.
11. Oda sıcaklığında 10,000 xg 30 saniye santrifüj edildi.
12. Mini kolona 500 µl RNW Buffer eklendi.
13. Oda sıcaklığında 10,000 xg 30 saniye santrifüj edildi.
14. Oda sıcaklığında 12,000 xg 'de 1 dk daha santrifüj edildi.
15. Kolon membranının merkezine 50 µl nükleaz içermeyen su eklendi. 1 dk bekletildi.
16. Oda sıcaklığında 12,000 xg 'de 1 dk daha santrifüj edildi.

İzole edilen RNA 'ların saflık ölçümü yapıldıktan sonra -80°C'ye kaldırıldı.

### ***RNA Miktarının Spektrofotometrik Olarak Belirlenmesi***

İzolasyonu yapılan RNA'ların saflık seviyelerini değerlendirmek için RNA konsantrasyonları Nanodrop cihazı (Thermo Scientific, Nanodrop 2000c) kullanılarak ölçüldü. Bunun için öncelikle 1µl nükleaz içermeyen su Nanodrop cihaz kaidesi üzerine eklendi ve cihazdaki program ile kör alındıktan sonra, örneklerden alınan 1µl cihaza konulup 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbansları alınıp çıkan A260/A280 değerlerine göre RNA'ların saflıkları seviyeleri belirlendi.

**Tablo 6.** Örneklerin RNA konsantrasyonları.

<b>Örnek</b>	<b>RNA konsantrasyonu</b>	<b>260/280</b>
<b>Kontrol</b>	4214,5 ng/ µL	1,96
<b>VB50</b>	5238 ng/ µL	2,1
<b>VB100</b>	3208,5 ng/ µL	1,94

### **Mikrodizin Analiz İçin Örneklerin Hazırlanması**

Total RNA izole edilen örnekler mikrodizin analiz için hizmet alımı yapılan Macrogen (Güney Kore) şirketine gönderildi. Firmanın talimatları gereği uluslararası

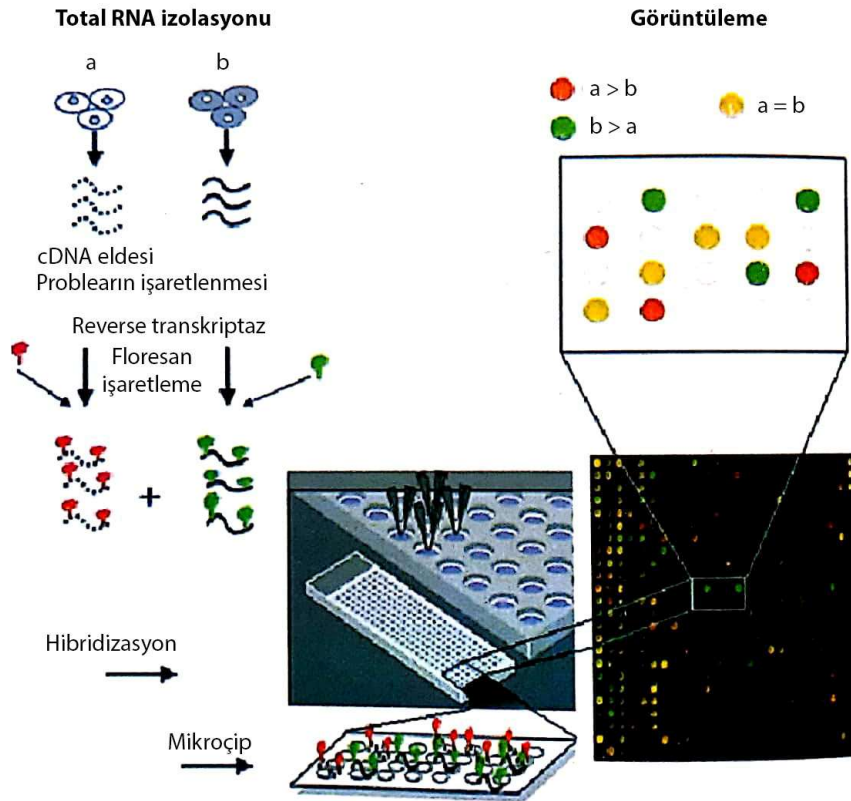
nakliye öncesi etanol presipitasyon metodu uygulandı. Bu şekilde hazırlanan örnekler oda ısında transfer edilmeye uygun hale getirildi.

Bunun için daha önce ölçülen konsantrasyonlardan yola çıkılarak 10 µL total RNA solüsyonu yeterli olarak değerlendirildi ve yeni bir ependorfa alındı.

RNA solüsyonuna 0,1 hacim ( $0,1 \times 10 \mu\text{L} = 1 \mu\text{L}$ ) 3 M Sodyum Asetat (NaAcetate, pH 5.2) eklendi ve yavaşça karıştırıldı.

Elde edilen toplam RNA solüsyonunun 2 katı kadar ( $2 \times 11 \mu\text{L} = 22 \mu\text{L}$ ) %100 etanol eklenip karıştırıldı. 3 deney grubu için de aynı şekilde işlemler yapılarak gönderildi.

### Mikrodizin Analiz



Şekil 16. Mikrodizin analizi şematik gösterimi.

(169) numaralı referanstan değiştirilerek alınmıştır.

Bir mikrodizi tipik olarak, bir dizi veya ızgara benzeri formatta düzenlenmiş ve katı bir yüzeye/zara tutturulmuş mikroskopik noktalar topluluğu olarak

tanımlanmaktadır (170,171). Prob olarak adlandırılan bu noktalar (DNA/protein) hibridizasyon (172,173) adı verilen bir süreçle belirli bir gene karşılık gelen spesifik bir nükleik asit sekansına bağlanacağı şekilde tasarlanmıştır. Genellikle hedef olarak adlandırılan proba bağlı sekans, florofor gibi bir tür tespit edilebilir molekül veya boya ile işaretlenir (170). Bir prob ve hedefi arasındaki bağlanma seviyesi, tarandığında işaretlenen boya tarafından yayılan floresan veya sinyal ölçülerek elde edilir ve bu sinyal sırayla, hedef diziyi içeren spesifik genin ifadesinin bir ölçüsünü sağlar (172,174).

## **GERÇEK- ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU**

### **cDNA Sentezlenmesi**

Elde edilen Total RNA, cDNA sentez kiti (VitaScript™ FirstStrand cDNA Synthesis Kit PROCOMCURE) kullanılarak kit protokolüne uygun olarak cDNA'ya çevrildi.

1. RNA konsantrasyonları kit protokolüne göre yüksek olduğu için RNA'lar 1/10 oranında nükleaz içermeyen su ile dilüe edildi.
2. cDNA sentezi için örnekler ve kit içeriği buz üzerine çıkarıldı. 200 µL lik ependorflara cDNA sentez karışımı hazırlandı.
3. Her örnek için 4 µL Total RNA üzerine 4 µL 5x VS Reaction Buffer eklendi.
4. 72°C'de 5 dk Techgene thermal cyler içerisinde inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrasında 1 µL VitaScript™ Enzim Mix eklendi.
6. 11 µL nükleaz içermeyen su ile toplam hacim 20 µL'ye tamamlandı.
7. 20 µl içerik aynı cihazda reaksiyonu 1 saat 42°C'de inkübe edildi ardından VitaScript™ Ters transkriptazın inaktivasyonu için 80°C'de 10 dakika süreyle bekletildi.
8. Sentezlenen cDNA'lar nükleaz içermeyen su ile 80 µl'ye seyreltilerek çalışma gününe kadar -20°C'de muhafaza edildi.

## Primer Dizileri

PCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri Tablo 7 de gösterildi. Diziler Sentegen firmasından temin edildikten sonra firmanın gönderdiği protokole uygun miktarlarda nükleaz içermeyen su ile sulandırıldı. Ardından her birinin konsantrasyonu 100 µm olan stoklardan 10 kat dilüe edilip ara stok oluşturularak -20°C'de muhafaza edildi.

**Tablo 7.** Primer dizileri.

Primer adı	Forward (sense)	Reverse (antisense)
<b>GAPDH</b>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA
<b>UCP-1</b>	AGGCTTCCAGTACCATTAGGT	CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT
<b>UCP-1</b>	GCTTGCCTCACTCAGGATTGG	CCAATGAACACTGCCACACCTC
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	GCCCTTTGGTGACTTTATGGA	GCAGCAGGTTGTCTTGGATG
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	ATGTGCAGCCAAGACTCTGTA	CGCTACACCACTTCAATCCAC
<b>HSL</b>	GTCATCTCCTATGACCTACGG	TCCGTGGATGTGAACAACCAGG
<b>Tfam</b>	GAGGCAAAGGATGATTCGGCTC	CGAATCCTATCATCTTTAGCAAGC
<b>AMPK <math>\alpha</math>1</b>	GGTGTACGGAAGGCAAATGGC	CAGGATTCTTCCTTCGTACACGC
<b>FASN</b>	CACAGTGCTCAAAGGACATGCC	CACCAGGTGTAGTGCCTTCCTC
<b>PLIN1</b>	GAGAAGGTGGTAGAGTTCCTCC	GTGTGTCGAGAAAGAGTGTTGGC
<b>IFi202B</b>	AAGAAAGGCTGGTTGATGGAGAG	GGTCAGTTGTCCAGATACCACC

## Reaksiyon Kurulumu

*Verbascoside* muamelesi sonrasında trizol ve kit ile total RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi gerçekleştirilen örneklerin gen ekspresyonları değerlendirilmek üzere reaksiyon kurulumu gerçekleştirildi. Bunun için 2X Magic SYBR Mix (PROCOMCURE) protokole uygun olarak kullanıldı. Hesaplamalar bir örnek için son hacim 10 µL olacak Tablo 8’da gösterildiği gibi yapıldı. Öncelikle kullanılacak her bir primer için duplike çalışılacak örnek sayısına göre ayrı bir ependorfta bu karışım

hazırlandı. Ardından her kuyuya 19 µL karışımdan ilave edildi ve en son örneklerin cDNA'ları üzerine eklenerek 96 kuyulu mikrolaka yüklendi.

**Tablo 8.** Reaksiyon karışımı.

İçerik	Hacim	Final Konsantrasyonu
2X Magic SYBR Mix	5 µL	1X
cDNA	1 µL	Max 2 µL
Forward primer (10 µM)	0,25 µL	0,05-0,9 µM (her biri)
Reverse primer (10 µM)	0,25 µL	0,05-0,9 µM (her biri)
Nükleaz içermeyen su	3,5 µL	

Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) *pikoreal 96 real-time thermal cycler* cihazında Tablo 9 de gösterilen değerlerde reaksiyon çalıştırıldı.

**Tablo 9.** RT-PCR protokolü.

Basamak	Döngü sayısı	Sıcaklık-Süre
İlk denatürasyon	1	95 °C'de 5 dakika
Çoğaltma (anneal)	40	95 °C'de 10 saniye 60 °C'de 15 saniye 72 °C'de 20 saniye
Son uzama	1	72 °C'de 2 dakika

Reaksiyon sonucu elde edilen veriler kullanılarak gen ekspresyon miktarları referans genler ile rölatif olarak belirlenmiştir. Gen ekspresyonlarının rölatif değişimi, gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) referans genine göre analiz edilmiştir.  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  yöntemi, RT-PCR deneylerinden gen ekspresyonundaki göreceli değişiklikleri analiz etmenin uygun bir yoludur (175). Bu yöntem tedavi grubundaki hedef transkriptin PCR sinyalini, kontrol grubu ile ilişkilendirir. Öncelikle hedef transkriptin gen kopyalarının Ct (Cycle Threshold) değerleri ile referans genin Ct değerleri



arasındaki fark alındı ( $\Delta Ct$ ). Ardından tedavi gruplarındaki ve kontrol grubunun  $\Delta Ct$  ortalamaları hesaplandı. Tedavi grubu ortalamasından kontrol grubu ortalaması çıkarılarak  $\Delta\Delta Ct$  elde edildi. Ardından excell ile  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü kullanılarak örnekler arasındaki katlı değişimler hesaplandı.

### ***İstatistiksel analiz***

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma, ortanca (en küçük-en büyük değerler) ile ifade edilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (post hoc: Tukey Testi) kullanılmıştır. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### ***Mikrodizin analizi istatistik***

Mikrodizin analizi grup sayısının az olması ve 3T3-L1 hücre hattının fare kökenli olmasından dolayı minimum örnek gereksinimi olmayan, fare mRNA ekspresyon analizi *Affymetrix Gene 2.0 ST Array* yapılarak gerçekleştirildi.

Biyoinformatik analizler için MacroGen firmasından destek alındı. Bu analizler;

1. Mikrodizine gönderilen örneklerin analize uygunluğu, RNA kalitesi Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Amerika) cihazı ile ölçüldü.
2. Veriler Affymetrix® Power Tools'da uygulanan güçlü çoklu ortalama robust multi-average (RMA) yöntemi ile özetlendi ve normalleştirildi. Sonucu gen seviyesinde RMA analizi ile aktararak ve farklı şekilde eksprese edilen gen (differentially expressed gene) (DEG) analizi gerçekleştirildi.
3. Ekspresyon verilerinin istatistiksel anlamlılık kat değişimi (fold change) (fc) kullanılarak belirlendi. Bir DEG seti için, benzerliğin bir ölçüsü olarak tam bağlantı ve Öklid mesafesi kullanılarak Hiyerarşik küme analizi gerçekleştirildi.
4. Anlamlı prob listesi için Gene-Enrichment and Functional Annotation analizi, Gen Ontoloji (GO) ve Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) yolak analizi kullanılarak gerçekleştirildi.

**GO Analizi:** Genlerin ontolojik yani hücresel bileşen, biyolojik süreç ve moleküler fonksiyonlarına göre ortaya konulması amacıyla yapıldı.

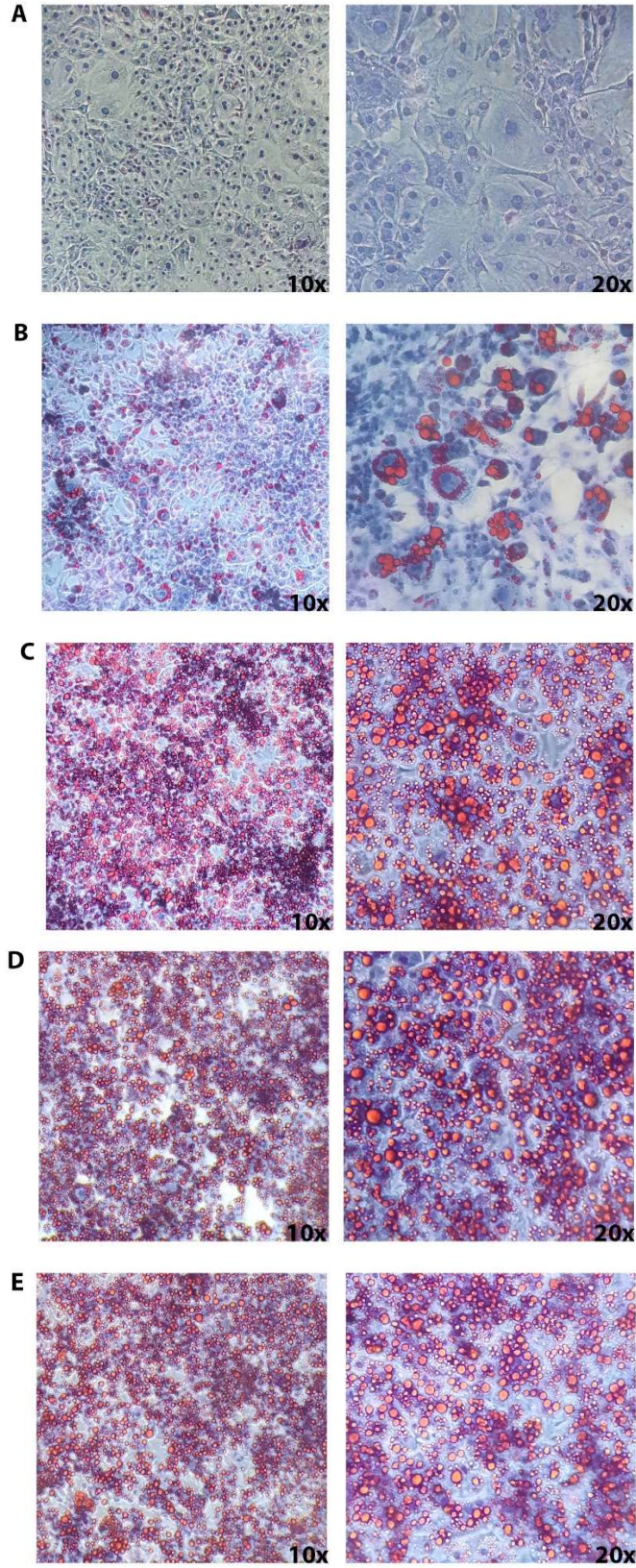
**KEGG Yolak Analizi:** Genlerin birbirleri ile olan ilişkileri ve hücre metabolizması hakkında bilgi vermek için gerçekleştirildi.

5. Farklı şekilde ifade edilen genlerin tüm veri analizi ve görselleştirmesi, R 3.3.2 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) kullanılarak gerçekleştirildi.

## **BULGULAR**

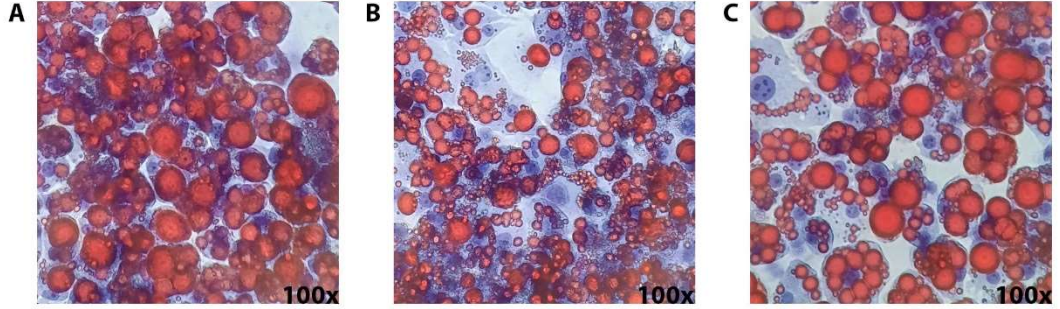
### **OİL RED O BOYAMA SONUÇLARI**

Deney modelinin uygunluğu ve polifenol muamelesi sonucu hücrelerde oluşan değişimlerin analizi için deney grupları preadiposit, olgun, hipertrofik adiposit ve farklı VB dozları uygulanan hipertrofik adipositler olarak belirlendi ve sonuçlar kalitatif olarak değerlendirildi (Şekil 17). Farklılaşma öncesi preadipositler ile olgun ve hipertrofik adiposit arasındaki farkların oluşumu ile modelin uygunluğu tespit edildi. Ancak hipertrofik adipositlere VB uygulanması sonucu gruplar arası farklılık gözlenmedi (Şekil 18).



Şekil 17. Oil Red O boyama sonuçları (10x, 20x).

Deney grupları A) Farklılaşma öncesi preadiposit B) Olgun adiposit (10. Gün), C) Preadipositten adiposite farklılaştırılıp daha sonra hipertrofik adiposit hale getirilen hücreler (kontrol), D) Hipertrofik hale getirilip 18.gün 48 saat 50  $\mu\text{M}$  *Verbascoside* ile inkübe edilen hücreler (V50), E) Hipertrofik hale getirilip 18.gün 48 saat 100  $\mu\text{M}$  *Verbascoside* ile inkübe edilen hücreler (V100). Boyama sonucu nötr lipidler kırmızı ve çekirdekler mavi olarak görünmektedir.



**Şekil 18.** Oil Red O boyama sonuçları (100x).

Sırasıyla A) Preadipositten adiposite farklılaştırılıp daha sonra hipertrofik adiposit hale getirilen hücreler (kontrol), B) Hipertrofik hale getirilip 18.gün 48 saat 50  $\mu\text{M}$  *Verbascoside* ile inkübe edilen hücreler (V50), C) Hipertrofik hale getirilip 18.gün 48 saat 100  $\mu\text{M}$  *Verbascoside* ile inkübe edilen hücreler(V100). Boyama sonucu nötr lipidler kırmızı ve çekirdekler mavi olarak görünmektedir.

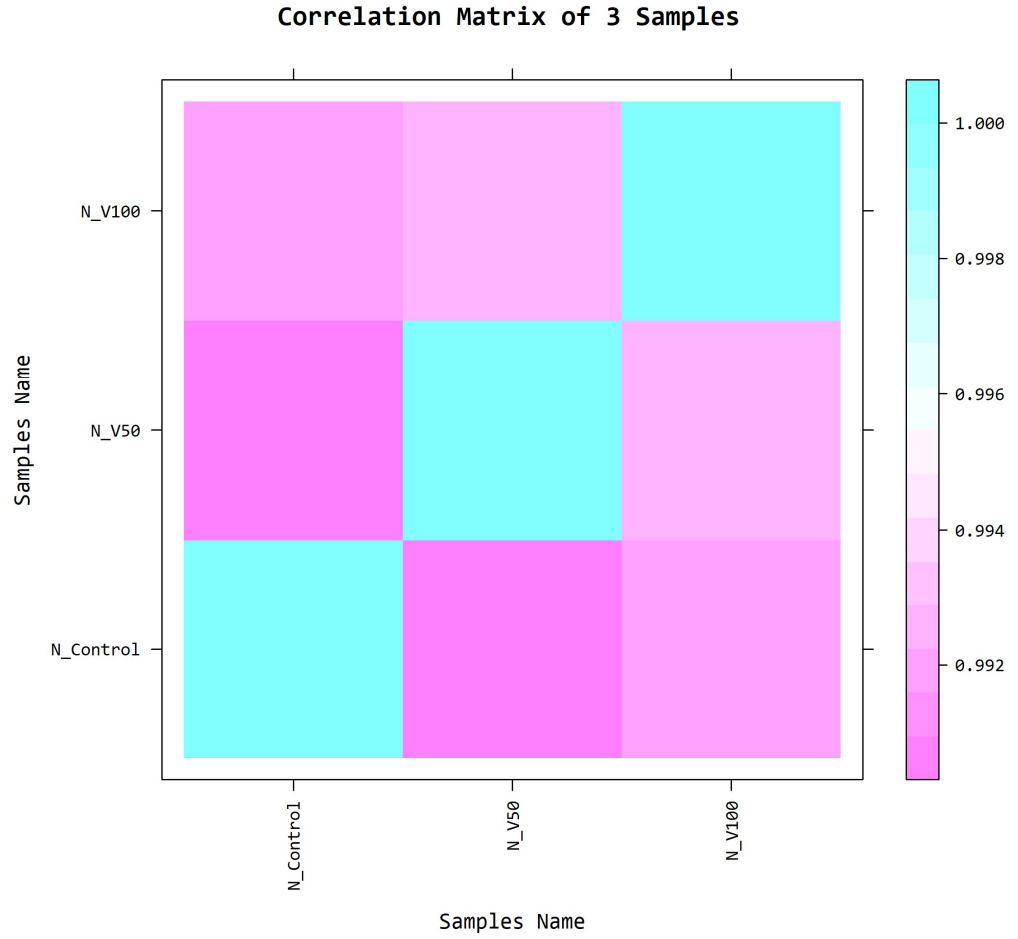
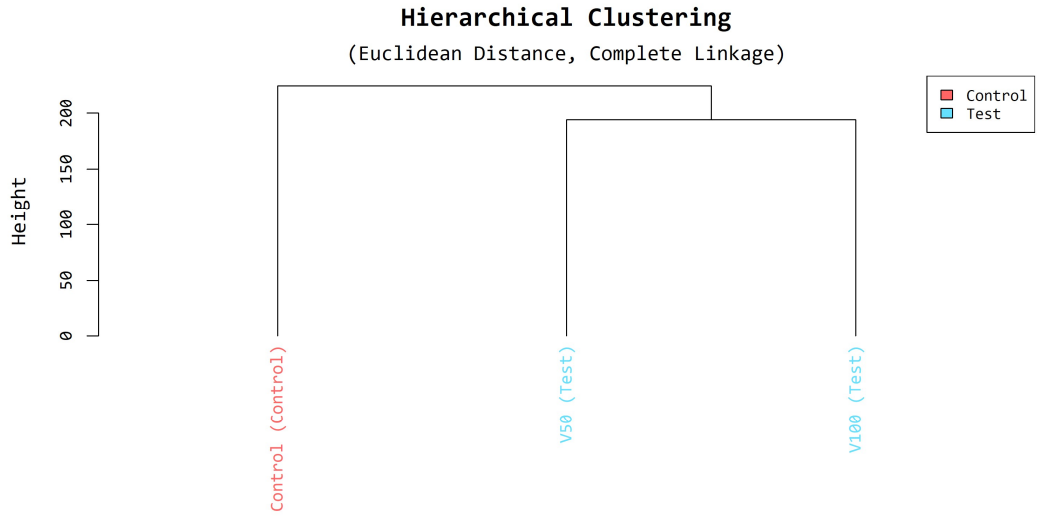
## MİKRODİZİN ANALİZİ SONUÇLARI

Analiz öncesi ilk olarak gönderilen numunelerde RNA da olabilecek kırıkların değerlendirilmesi ve mikrodizin analizine uygunluğunun kontrolü amacıyla RNA integritesi (RIN) analizi yapıldı. RIN değeri örneklerin kaliteli olup olmadığını yani analize uygunluğunu göstermektedir (Şekil 19). 8'in üzerindeki değerler uygun olarak kabul edilmekte olup; örneklerde değerlendirmeye engel düzeyde herhangi bir RNA kırığı olmadığı tespit edildi.

#	Sample Name	Purity (A260/A280)	Purity (A260/A230)	Conc. (ng/ul)	Volume (ul)	Total Amount	RIN	rRNA Ratio	Result*
1	Control	2.1	2.18	1746.6	17	29.69	9.6	1.6	Pass
2	V50	2.11	2.2	1504	17	25.57	9.9	2	Pass
3	V100	2.11	2.2	1347.7	17	22.91	9.6	1.6	Pass

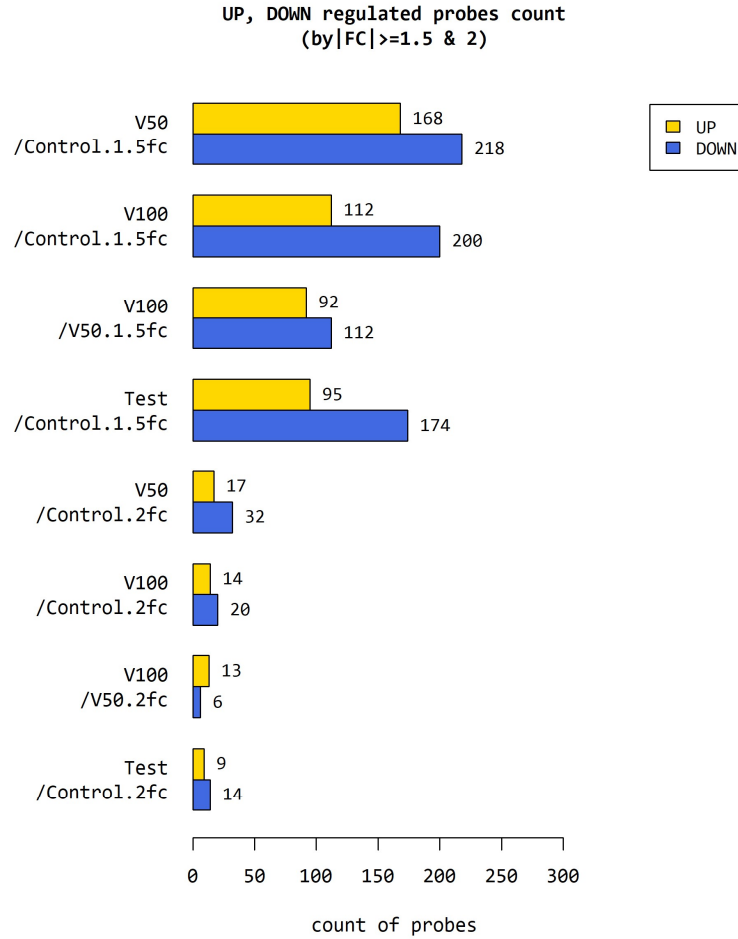
**Şekil 19.** RNA kalite kontrol sonuçları.

Mikrodizin analizi sonucu örneklerin bulunduğu filogenetik ağaç ve örnekler arası korelasyon Şekil 20' de gösterildi. Kontrol grubunun VB uygulanan gruplardan farklı filogenetik ağaçta olması polifenol verilen gruplara aynı uygulama yapıldığını göstermektedir. Gruplar arası korelasyon ise aynı örnekler arasında, aynı hücre hattı kullanılarak deneyler gerçekleştirildiği için 1'e yakın ve aynı olarak tespit edilmiştir. Sayısal farklar gen ifadesi farklılığından kaynaklanmaktadır.



Şekil 20. Örnekler arasındaki korelasyon analizi.

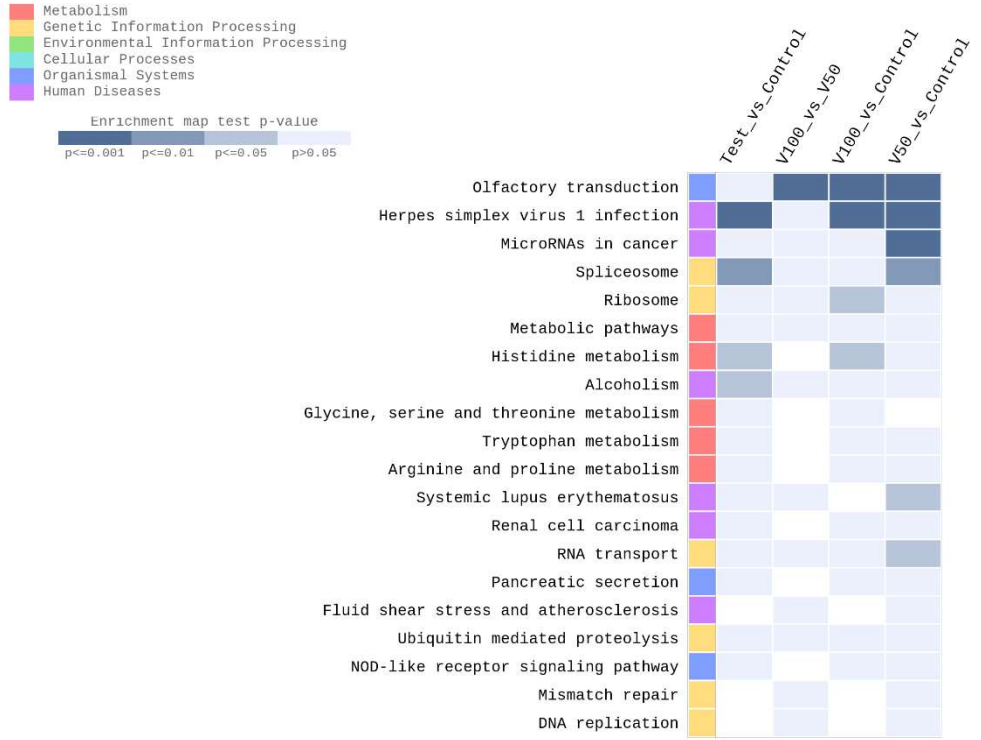
Şekil 21’de numuneler arasında yapılan kıyaslamalarla 1,5 ve 2 kat artan/azalan prob sayıları gösterilmiştir.  $|Fc| \geq 1,5$  & 2 artışlar anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 21. Mikrodizin analizi sonucu ifadesi artan azalan prob sayıları.

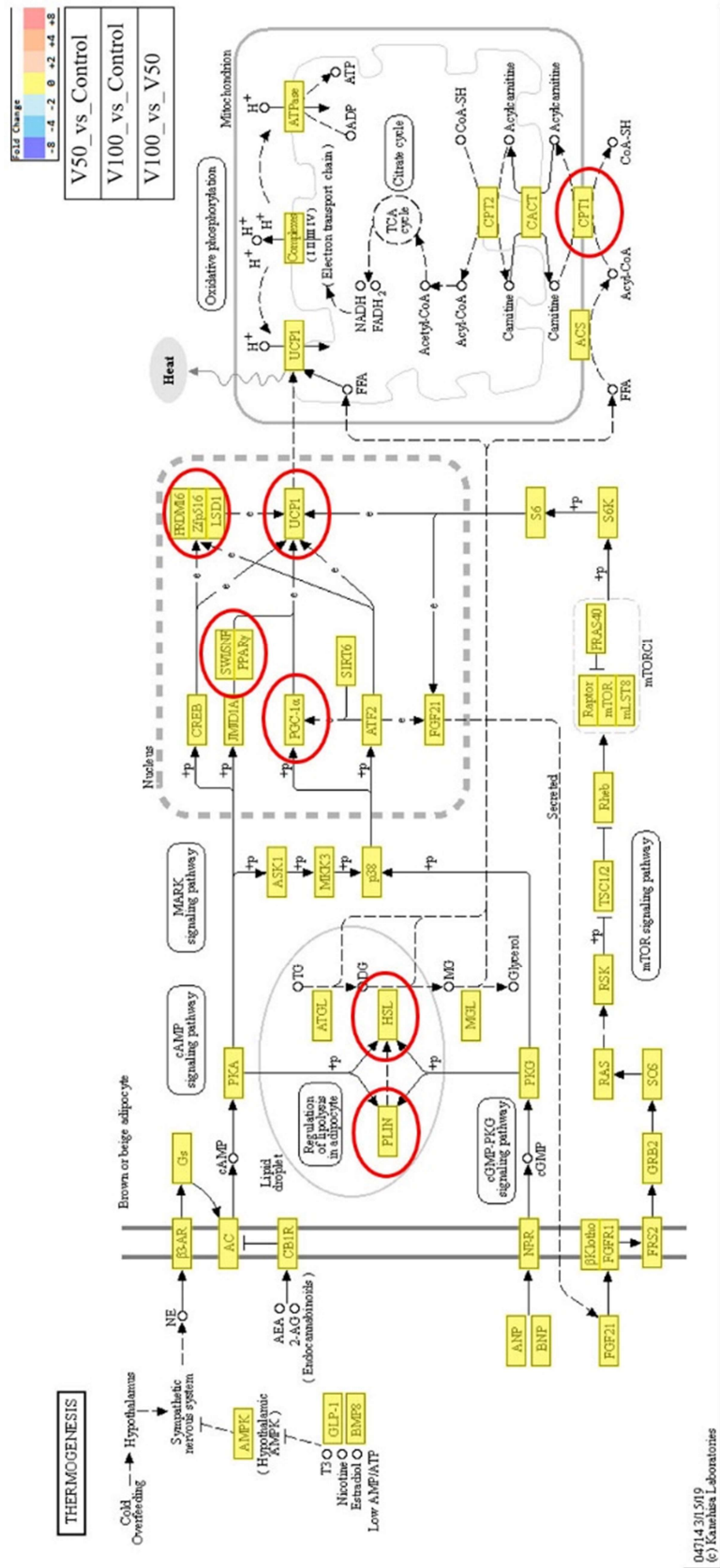
Mikrodizin sonuçlarına göre genlerin ontolojik; biyolojik süreç, moleküler fonksiyon ve hücrel bileşenlerin analizi heatmap üzerinde (Şekil 22) gösterilmiş ancak metabolik yollarda anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ).





**Şekil 22.** KEGG heatmap analiz sonuçları.

KEGG analizi sonucu termogenez yolağı için V50/kontrol, V100/kontrol ve V50/V100 kıyaslamalarında anlamlı farklılık gösteren herhangi bir gen bulunamamıştır (Şekil 23). Hedef genlerden bazıları kırmızı ile işaretlenmiştir.



Şekil 23. Termogenez yolak analizi.

Analiz sonucu V50/kontrol anlamlı (1,5 ve üzeri katlı değişim gösteren) artış/azalış olan 386 gen tarandı. Bunlardan kodlanmayan genler (ENS/XR) çıkarıldı, 108 adet protein kodlayan gen tespit edildi. Aynı işlem V100/kontrol için de yapıldı. 312 gen tarandı, 86 adet protein kodlayan gen tespit edildi.

Son olarak V50/kontrol ve V100/kontrol grupları arasında ortak artış /azalış gösteren 24 adet protein kodlayan gen tespit edildi. Ancak bunların içerisinde 3 tanesi (Ifi202b, Rps 26, Rps 24) adipoz dokuda eksprese edilmekteydi (Tablo 10’da kırmızı ile işaretlenmiştir). Yapılan literatür taraması sonucu tez projemizde araştırdığımız konuyla ilgili olabilecek yalnızca Ifi202b genine ait çalışmalara rastlandı. Bu nedenle çalışmaya dahil edildi.

**Tablo 10.** V50/kontrol ve V100/kontrol grupları arasında 1,5 kat ve üzeri artış/azalış gösteren ortak genler.

	Gene_Symbol	mRNA Accession	V50/Control.fc	V100/Control.fc	Gene Description
1	Tceb1	NM_001310470	1,813190	1,847904	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1
2	Ptp4a1	NM_011200	1,507220	1,507220	protein tyrosine phosphatase 4a1
3	Ifi203	NM_001302649	1,526090	1,526090	interferon activated gene 203
4	Ifi202b	NM_008327	1,529988	1,536353	interferon activated gene 202B
5	Rps26	NM_013765	-2,219647	-2,348110	ribosomal protein S26
6	Rps24	NM_011297	-1,679416	-1,559475	ribosomal protein S24
7	4530505L14Rik	NM_029131	-1,895598	-1,895598	RIKEN cDNA 4530505L14 gene
8	Dcpp1	NM_019910	-1,896961	-1,896961	demilune cell and parotid protein 1
9	Unc93a	NM_199252	-1,618548	-1,684955	unc-93 homolog A (C. elegans)
10	Zfp871	NM_172458	1,618133	1,618133	zinc finger protein 871
11	Zfp937	NM_001142411	1,616586	1,616586	zinc finger protein 937
12	Bpifa5	NM_025990	-1,572860	-1,572860	BPI fold containing family A, member 5
13	Gm14322	NM_001243903	1,582999	1,639539	predicted gene 14322
14	Olf1019	NM_147015	-1,646246	-1,697051	olfactory receptor 1019
15	Gm4871	NM_001101463	1,878290	1,877119	predicted gene 4871
16	Aoc1	NM_001161621	-1,577150	-1,577150	amine oxidase, copper-containing 1
17	Tigd2	NM_001081145	1,520283	1,518514	tigger transposable element derived 2
18	Klk1b9	NM_010116	-1,623807	-1,717786	kallikrein 1-related peptidase b9
19	Saa2	NM_011314	-1,637177	-1,637177	serum amyloid A 2
20	Olf663	NM_001011757	-1,603740	-1,991327	olfactory receptor 663
21	Defa21	NM_183253	-2,298018	-1,964715	defensin, alpha, 21
22	Apoo	NM_001199337	1,829818	1,829818	apolipoprotein O
23	Zxdb	NM_001081473	1,927713	1,927713	zinc finger, X-linked, duplicated B
24	Kctd12b	NM_175429	1,586239	1,586239	potassium channel tetramerisation domain containing 12b

Hipotezimizde belirtilen ve adiposit kahverengileşmesi ile ilgili olabilecek genlerin mikrodizin analiz verileri Tablo 11’de gösterilmiştir.

**Tablo 11.** Çalışılması planlanan tüm genlerdeki artış/azalış miktarları.

Gene_Symbol	V50/Control.fc	V100/Control.fc	V100/V50.fc
Ucp1	1,000000	1,000000	1,000000
Pparg	-1,030790	-1,159626	-1,124988
Ppargc1a (PGC-1 $\alpha$ )	1,140100	1,140100	1,000000
Prdm16	1,000000	1,000000	1,000000
Srebf1	-1,030925	-1,043666	-1,012358
Cpt1c	1,000000	1,000000	1,000000
Lipe (HSL)	-1,036134	-1,059512	-1,022563
Sirt1	1,000000	1,000000	1,000000
Tnfrsf9 (CD137)	1,000000	1,000000	1,000000
Tfam	1,000000	1,000000	1,000000
Fasn	-1,071447	-1,132334	-1,056828
Plin1	-1,063765	-1,168858	-1,098793
Prkaa1 (AMPK $\alpha$ 1)	1,096412	1,023556	-1,071179

Hipotezimize uygun genlerin mikrodizin analizi sonucu RT-PCR yapılmadan literatür yeniden gözden geçirilerek validasyonu yapılacak genler seçilerek primerleri temin edildi. Ancak bunlardan yalnızca 5 tanesi ile ilgili veri elde edildi (Tablo 12).

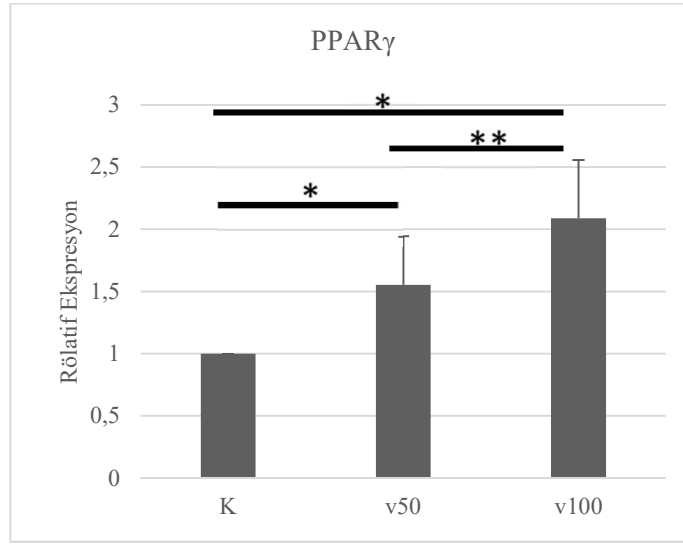
**Tablo 12.** Primer seçimi.

Hipotez	Mikrodizin sonrası	RT-PCR ile veri elde edilen
UCP-1	UCP-1	PPAR $\gamma$
PPAR $\gamma$	PPAR $\gamma$	HSL
PGC-1 $\alpha$	PGC-1 $\alpha$	AMPK
PRDM16	HSL	PLIN1
SREBP1	Tfam	Ifi202b
CPT1	PLIN1	
HSL	AMPK	
SIRT1	FASN	
CD137	Ifi202b	
Tfam		

## RT-PCR SONUÇLARI

Tüm gruplar arasında hedef genler olan PPAR $\gamma$ , AMPK, HSL, PLIN1, Ifi202b mRNA ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttur ( $p<0,05$ ).

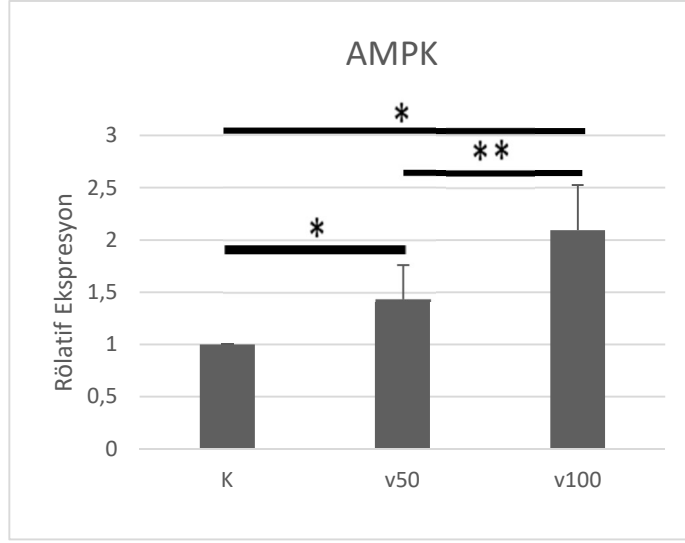
3T3-L1 hipertrofik hale getirilmiş hücre hattında PPAR $\gamma$  mRNA ekspresyonu V50 grubunda kontrol grubuna göre ( $p=0,022$ ), V100 grubunda kontrol grubuna göre ( $p=0,0001$ ) istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 24). Aynı zamanda V100 grubunda da V50 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur ( $p=0,028$ ).



**Şekil 24.** PPAR $\gamma$  mRNA ekspresyonunun rölatif değişimleri.

(K: Kontrol, V50: *Verbascoside* 50  $\mu$ M, V100: *Verbascoside* 100  $\mu$ M, Ortalama  $\pm$  standart sapma;  $n=6-7$ ,  $p<0,05$  istatistiksel olarak anlamlı farklılık kabul edilmiştir (\*  $p<0,05$ : kontrol grubundan fark; \*\* $p<0,05$ ; V50 grubundan fark).

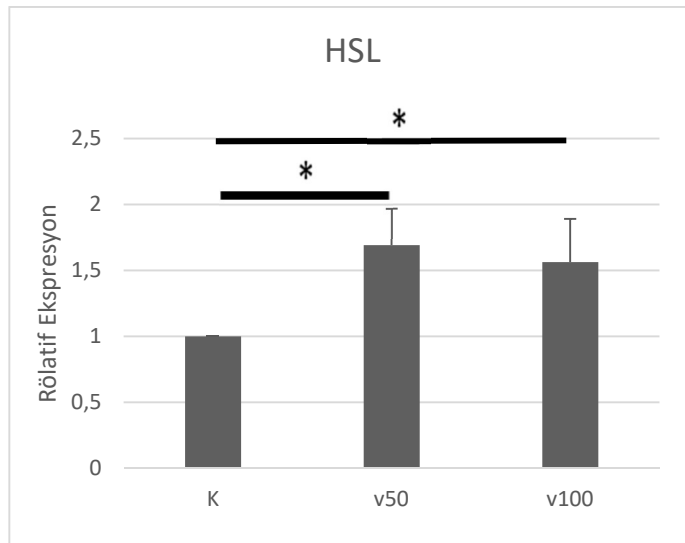
AMPK mRNA ekspresyonu da V50 grubunda kontrol grubuna göre ( $p=0,043$ ), V100 grubunda kontrol grubuna göre ( $p=0,0001$ ) istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir (Şekil 25). V100 grubu da V50 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ( $p=0,003$ ).



**Şekil 25.** AMPK mRNA ekspresyonunun rölatif değışimleri.

(K: Kontrol, V50: *Verbascoside* 50  $\mu$ M, V100: *Verbascoside* 100  $\mu$ M, Ortalama  $\pm$  standart sapma; n=6-7,  $p<0,05$  istatistiksel olarak anlamlı farklılık kabul edilmiştir (\*  $p<0,05$ : kontrol grubundan fark; \*\* $p<0,05$ ; V50 grubundan fark).

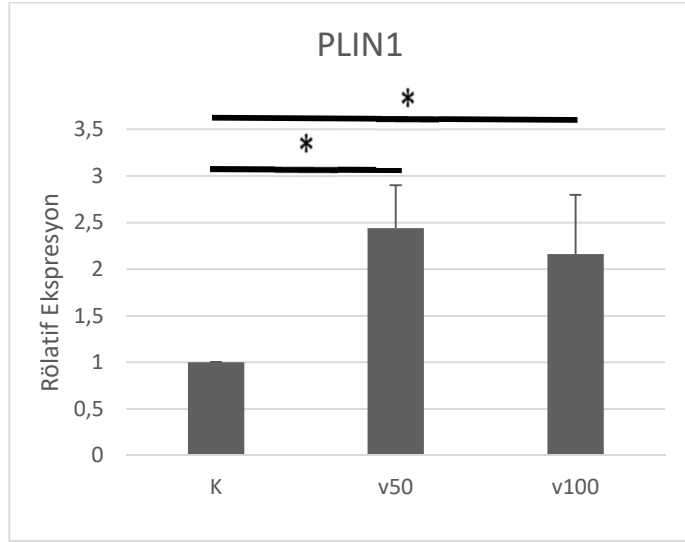
3T3-L1 hipertrofik adipositlerinde HSL mRNA ekspresyonu; V50 grubunda kontrol grubuna göre ( $p=0,0001$ ), V100 grubunda da kontrol grubuna göre ( $p=0,002$ ) istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 26). V50 ve V100 grupları arasında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p=0.626$ ).



**Şekil 26.** HSL mRNA ekspresyonunun rölatif değışimleri.

(K: Kontrol, V50: *Verbascoside* 50  $\mu$ M, V100: *Verbascoside* 100  $\mu$ M, Ortalama  $\pm$  standart sapma; n=6-7, p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık kabul edilmiştir (\* p<0,05: kontrol grubundan fark).

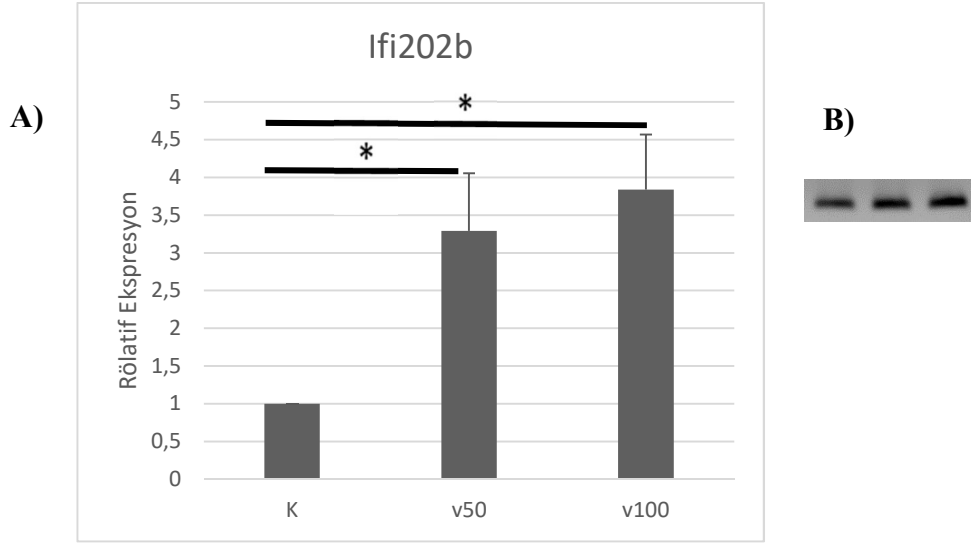
PLIN1 mRNA ekspresyonu ise V50 grubunda kontrol grubuna göre (p=0,0001), V100 grubunda da kontrol grubuna göre (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 27). V50 ve V100 gruplarının ikili karşılaştırılması arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0,507).



**Şekil 27.** PLIN1 mRNA ekspresyonunun rölatif değişimleri.

(K: Kontrol, V50: *Verbascoside* 50  $\mu$ M, V100: *Verbascoside* 100  $\mu$ M, Ortalama  $\pm$  standart sapma; n=6-7, p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık kabul edilmiştir (\* p<0,05: kontrol grubundan fark).

3T3-L1 hipertrofik adipositlerinde Ifi202b mRNA ekspresyonu V50 ve V100 gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır (p=0.0001) (Şekil 28-A). Ancak V50 ile V100 gruplarının arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p=0,256). Aynı zamanda PCR ürünü eşit hacimde %1,5 agarose jele yüklenip görüntülenerek (Şekil 28-B) bu sonuç teyit edilmiştir.



**Şekil 28.** Ifi202b mRNA ekspresyonu ve agarose jel görüntüsü.

A) Ifi202b mRNA ekspresyonunun rölatif değışimleri (K: Kontrol, V50: *Verbasoside* 50  $\mu$ M, V100: *Verbasoside* 100  $\mu$ M, Ortalama  $\pm$  standart sapma; n=6-7, (\* p<0,05: kontrol grubundan fark). B) RT-PCR agarose jel görüntüsü (gruplar soldan sağa sırasıyla K, V50, V100).



## TARTIŞMA

Gün içinde çoğu zaman oturarak, yüksek kalorili yiyeceklerin yoğun tüketildiği ve çok az veya tamamen fiziksel aktivite olmadan sürdürülen modern yaşam tarzı, obeziteye neden olan çok önemli bir faktördür. Bu durum dünya çapında halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Ancak, obezitede gözlenen aşırı disfonksiyonel yağ dokusunun patolojik birikimi nedeniyle bu durum özellikle endişe vericidir. Obezitede T2DM, kalp hastalığı, IR, hiperglisemi, dislipidemi, hipertansiyon ve bazı kanser türleri dahil olmak üzere diğer birçok hastalığın ortaya çıkmasında rolü olan önemli bir risk faktörüdür (176–178). Obezite ile ilişkili bütün bu sağlık sorunlarındaki küresel artış nedeniyle adiposit biyolojisi son yıllarda yoğun bir şekilde incelenmeye başlanmıştır.

Adiposit proliferasyonu, farklılaşması, adipokin salgılanması ve gen / protein ekspresyonu gibi durumların mekanizmalarının belirlenmesinde in vitro modeller ve özellikle de 3T3-L1 hücreleri gibi yerleşik hücre hatları, sıklıkla kullanılmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir derlemede (134) polifenollerin de dahil olduğu fitokimyasalların in vitro deneylerde (özellikle 3T3-L1 modeli) adipogenez/lipogenezini azaltarak ya da lipoliz/YA oksidasyonunu artırıp ve bu sayede yağ doku kahverengileşmesini indükleyerek antiobezite etkileri olduğu gösterilmiştir. Çalışmamız kapsamında da bu yollardan hedef moleküller seçilerek VB'nin adiposit kahverengileşmesine olası etkilerinin incelenmesi planlanmıştır.

Tez projemizde; VB'nin yağ dokudaki kahverengileşmeye olası etkilerinin in vitro olarak test edilmesi amacıyla 3T3-L1 preadipositleri kullanılmıştır. Çalışmamızda hücreler öncelikle düşük glukozlu besi yeri ile çoğaltılarak deney grupları için uygun sayıda hücrenin elde edilmesi sağlanmıştır. Yeterli sayıya ulaştıklarında deneyler için ekilen hücreler yine aynı besi yeri ile takip edilerek konfluent olmaları sağlanmıştır. Hücreler deneylerin gerçekleştirileceği kültür kaplarında yaklaşık %80 yoğunluğa ulaştığında, preadipositlerin adipositlere farklılaşmasını indüklemek için ortama farklılaştırma kokteyli (IBMX, DEX, INS, FBS) içeren besi yeri eklenmiş ve hücreler bu besi yerinde 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yüksek glukoz ve INS içeren besi yeri 18 gün boyunca iki günde

bir değiştirilerek hücreler takip edilmiştir. Böylece adipositlerdeki lipid damlacıklarının çap ve sayılarında artış sağlanmıştır. Ardından preadipositlerin olgun (10. gün) ve hipertrofik (18. gün) hale dönüştürüldüğü yapılan Oil Red O boyaması ile mikroskopik olarak analiz edilmiş ve modelimizin başarılı olduğu görülmüştür. Seçtiğimiz polifenol olan VB hipertrofik hale getirilmiş adipositlere farklılaşma sonrası 18. günde 50 µM ve 100 µM olarak 48 saat uygulanmıştır. Uygulanan bu polifenol ile yağ hücresinde oluşturulan hipertrofinin azaltılacağı, termogenezin, kahverengileşmenin indükleneyeceği, lipoliz/lipid oksidasyonunun arttırılacağı hipotezi ile deneylere başlanmıştır. Deneyin sonunda hücreler trizol kullanılarak enzimatik olarak kaldırılıp, ticari bir kit yardımıyla total RNA' ları izole edilmiştir. RNA saflık ve konsantrasyon ölçümleri sonrası mikrodizin analizi için bir miktar numune etanol presipitasyon protokolü ile hazırlanarak hizmet alımı yapılan firmaya gönderilmiştir. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde lipid ve karbonhidrat metabolizması ayrıca adiposit kahverengileşmesi ile ilgili genlerin ekspresyon düzeylerinde anlamlı artış/azalış gözlenmemiştir. Bunun üzerine sonuçlar içerisinde deney gruplarında ortak olarak anlamlı artış/azalış gösteren diğer genler taranmıştır. Bunlar içerisinde hipotezimizle ilişkili olabilecek interferon ile aktive edilen gen 202B (Ifi202b) ekspresyonunun her iki deney grubunda da anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ek olarak mikrodizin analizinde gruplar arasında bazı gen ekspresyonlarında çok az ya da hiç değişim olması, aynı zamanda değişiklik görülen gen ekspresyonlarının validasyonu için RT-PCR yapılmıştır.

RT-PCR öncesi primerler seçilirken literatürden yüksek impakt faktörlü dergilerden tercih yapılmış ve senteze gönderilmeden önce G-C oranı, erime sıcaklığı (Tm), baz ve ürün uzunlukları kontrol edilmiştir. Çok fazla tekrarlı nükleotid dizileri olmayan ve kendi üzerine katlanma oranı düşük olan, aynı zamanda o genin varyantlarını da kapsayan dizilerin seçimine dikkat edilmiştir. Ancak temin edilen primerlerden yalnızca 5 tanesi (AMPK, PPARγ, HSL, PLIN1, Ifi202b) ile ilgili veri elde edilebilmiştir. Diğer primerler için kantitatif PCR yapılarak agarose jelle yüklenmiş ancak herhangi bir bant görülmemiştir. Pek çok sebepten gerçekleşebilecek olan bu durumun çözümü için gerekli bütçe ve süre kısıtlılıkları nedeniyle tez projemizde sonuç olarak elde edilebilen veriler sunulmuştur.

Çalışmamızda AMPK mRNA ekspresyonu hem 50 µM hem de 100 µM VB uygulanan grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Aynı zamanda 100 µM VB uygulanan grupla 50 µM arasında da anlamlı fark saptanmıştır. Bu durum doza bağlı olarak AMPK ekspresyonunun arttığını göstermektedir.

AMPK merkezi bir enerji sensörü olarak hareket eden, hücresel enerji homeostazında merkezi bir rol oynayan ve yağ dokunun yanı sıra karaciğer, hipotalamus ve iskelet kası dahil diğer birçok dokuda eksprese edilen bir enzimdir (23). AMPK, çeşitli biyolojik süreçlerde yer almasının yanı sıra, YA metabolizmasının, termogenezin ve YD'nin gelişiminin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Aktivasyon üzerine AMPK, YA sentezini inhibe eder ve oksidasyonunu (kaslarda ve karaciğerde) uyarır ayrıca adiposit lipogenezini ve lipolizi düzenleyici rolü de bilinmektedir. AMPK aktivatörleri YA oksidasyonunu artırarak, genetik olarak obez ob / ob farelerde plazma ve karaciğer trigliserit düzeylerinde azalmaya ve vücut ağırlığı artışında azalmaya, soğuktan kaynaklanan termogenezde artışa ve inguinal yağ deposunda kahverengileşmeye neden olabildiği de çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (179,180).

Yürütülen tez projemizde planlama, uygulama ve tartışma kısımlarında “İspanya-Miguel Hernandez University-Elche” IDiBE enstitüsünden Prof Dr. Maria Herranz-Lopez ve ekibiyle işbirliği halinde hazırlanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan dozlar daha önce yapılan bir çalışma esas alınarak belirlenmiştir (163). Bu çalışmada VB'nin AMPK aktivasyonuna olan etkileri araştırılmıştır. 3T3-L1 hücreleri farklılaşmadan 8 gün sonra yani olgun adiposit halde 24 saat 25 µM, 50 µM ve 100 µM konsantrasyonlarında uygulanan birleşimin AMPK aktivasyonu fosforile(p)-AMPK/AMPK oranı ile değerlendirilmiştir. Burada AMPK agonisti olarak bilinen bir ajan olan 5-Aminoimidazol-4-karboksamid-1-β-4-ribofuranosid (AICAR) pozitif kontrol olarak kullanılmış. VB 50 µM ve 100 µM dozlarında pozitif kontrole göre daha fazla AMPK aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (163).

Olivares-Vicente ve ark. 50 µM ve 100 µM dozlarda VB uygulamasıyla, 200 µg /mL LC ekstraktı (%27 VB içeren) uygulamasının, olgun adipositlerde p-AMPK/AMPK oranını yani AMPK aktivasyonunu benzer oranda arttırarak etki

ettiğini bulmuşlardır. Bu sonuçtan yola çıkarak VB'nin, ekstraktın AMPK aktive etme kapasitesinden sorumlu ana faktörlerden biri olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmadan farklı olarak tez projemizde hipertrofik hale getirilmiş adiposit hücreleri kullanılmış ve hücreler VB ile 48 saat inkübe edilmiştir. Diğer taraftan hücreler trizolle enzimatik olarak kaldırılarak RT-PCR ile AMPK  $\alpha$ 1 izorformunun mRNA ekspresyonu çalışılmıştır.

Bir diğer çalışmada ise hipertrofik hale getirilmiş (18. gün) adiposit hücreler LC ekstraktından elde edilen VB ile 54  $\mu$ g/mL ve 108  $\mu$ g/mL dozlarıyla 48 saat inkübe edilmiş ve gruplarda p-AMPK/AMPK oranı western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. VB'nin doza bağımlı olarak kontrol grubuna göre AMPK aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (14). Ancak p-AMPK/AMPK oranındaki artış LC ekstraktının (%27 VB içeren) 200 ve 400  $\mu$ g/mL uygulanmasıyla elde edilen artışa oranla çok daha düşük olarak tespit edilmiştir. Bu durum araştırmacıları ekstraktın içindeki diğer bileşiklerin de ekstraktın AMPK aktivasyon etkisine katkıda bulunduğu sonucuna yöneltmiştir. Bahsettiğimiz çalışmalardaki bulgular, çalışmamızda elde ettiğimiz AMPK mRNA ekspresyonu artışı sonucunu desteklemektedir. Çalışmamızda her ne kadar AMPK aktivasyonu western blot yöntemi ile değerlendirilememiş olsa da ortaya koyduğumuz mRNA artışı, bu enzimin ifadesini arttırarak AMPK aktivasyonunu sağlayabileceğinin göstergesi olabilir. Bunun için ileri çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde yer alan bir diğer çalışmada, Rodri ve ark., VB içeren bir diğer ekstrakt olan zeytin ağacı yaprağı (*Olea europaea*)'nın, hipertrofik (18. gün) 3T3-L1 adiposit modelinde hücre içi trigliserit birikimine ve immünofloresan yöntemle AMPK aktivitesine etkisini araştırmışlar ve ekstraktın AMPK'ya bağlı mekanizmalar yoluyla hücre içi lipid birikimini azalttığı sonucuna varmışlardır (181). Ekstraktın kromatografi analizi ile esas olarak VB'den oluşan fraksiyonlarının, adipositlerde AMPK aktivasyonunda VB'nin sorumlu ana ajan olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu bilgiler, bizim verilerimizle birlikte değerlendirildiğinde VB'nin AMPK'da artışa neden olabildiği sonucunu destekler niteliktedir.

Çalışmamız kapsamında değerlendirilen bir diğer parametre de PPAR $\gamma$  olup; PPAR $\gamma$  mRNA ekspresyonu da AMPK ile benzer şekilde çalışmamızda V50 ve V100

gruplarında kontrol grubuna göre, aynı zamanda V100 grubunda V50'ye göre anlamlı derecede artmış olduğu saptanmıştır.

PPAR'lar hücre büyümesi, morfogenez, farklılaşma ve homeostaz dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçleri düzenleyen transkripsiyon faktörleridir (182). PPAR $\gamma$ , hem beyaz hem de kahverengi adipositlerin farklılaşması ve hayatta kalması için gerekli olan transkripsiyon faktörüdür (183). Hem fare hem de insan çalışmalarında, PPAR $\gamma$  aktivatörü olan rosiglitazon tedavisinin, BYD'de termogenezden sorumlu KYD'den ayırt edici bir gen olan UCP-1'in ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir (61,93). PPAR $\gamma$  aktivasyonunun, fare epididimal yağ dokusundan türetilmiş beyaz preadipositlerinde in vitro olarak kahverengi adiposit benzeri hücrelerin oluşumunu indüklediği gösterilmiştir, bu da immünohistokimyasal boyamayla ortaya konduğu üzere hücrelerin yaklaşık %10'unun UCP-1 pozitif olmasını sağlamıştır (93).

Literatürde adiposit hücre hattında VB uygulanmasını takiben olası PPAR $\gamma$  mRNA ekspresyonunu inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak daha önce yapılan bir çalışmada olgun adipositlere 24 saat süreyle VB 108  $\mu\text{g}/\text{mL}$  uygulamasının indirekt yöntemle adiponektin ekspresyonunu PPAR $\gamma$  aracılı arttırdığı gösterilmiştir (14). Bu çalışma sonuçlarımızı destekler niteliktedir. Daha önceki çalışmaların kısıtlı sayıda olması nedeniyle etken maddesi VB olan ekstraktlarla yapılan çalışmalar ve polifenollerin PPAR $\gamma$  üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarla da sonuçlar ele alınmıştır.

İlk olarak, 3T3-L1 olgun (10. gün) adipositlerde, fenolik bileşikler bakımından zengin üzüm posası özütünün (*grape pomace extract*, GPE) 24 saatlik uygulamasıyla,  $\beta$ -adrenerjik uyarı sistemini (PKA, AMPK, p38, ERK) etkinleştirdiği gösterilmiştir (184).  $\beta$ -adrenerjik uyarının, mitokondriyal biyogenez (PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PRDM16 ve UCP-1) ve YA oksidasyonunda (ATGL) yer alan proteinlerin upregülasyonuna yol açtığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada in vivo olarak, fare inguinal BYD'de GPE'nin, adipoz doku kahverengileşmesi ile ilgili proteinlerin ekspresyonunu da arttırdığı bildirilmiştir (PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PRDM16, UCP-1). Çalışmamızda da benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla VB'nin her iki dozunda da PPAR $\gamma$  mRNA ekspresyon artışı gözlenmiştir.

Bunun yanısıra, literatürde etken maddesi VB olan ekstraktla yapılan çalışmada; HFD ile obezite modeli oluşturulan farelere MetA (LC ve HS kombinasyonu) (50 ve 100 mg/kg) ve LC ekstraktı (100 mg/kg) 8 hafta süreyle verilerek etkileri araştırılmıştır. LC ekstraktı verilen grupta, abdominal scBYD ve epididimal BYD'da PPAR $\gamma$  mRNA ekspresyonunun, normal yağlı diyetle (NFD) beslenen gruba göre arttığı ve ayrıca MetA 100 mg/kg uygulamasının HFD grubuna göre PPAR $\gamma$  ekspresyonunu anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (164). Çalışmada kullanılan MetA formülünün kromatografi analizinde ana bileşiğin VB olduğu ve %15-18 konsantrasyonlarda bulunduğu belirtilmiştir. LC ve MetA 50 mg/kg uygulanan gruplarda HFD ile beslenen gruba göre PPAR $\gamma$  ekspresyonunda anlamlı değişiklik bulunamamıştır. Bu araştırma ile sonuçlarımız değerlendirildiğinde in vivo LC ekstraktının emilimi ve vücutta dağılımı önemli bir husustur ve aynı zamanda ekstraktın ne kadar VB içerdiği ve serumdaki seviyeleri bilinmediği için bu etkinin ne kadarının VB ile ilişkili olabileceği kesin olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte yalnızca NFD ile beslenen gruba göre LC ekstraktı verilen grupta fark olması ve ayrıca LC ve HS kombinasyonu olan MetA 100 mg/kg grubunda HFD grubuna göre azalma olması; bu bitkilerin içerisindeki diğer metabolitlerin birlikte bir etki yaptığını da düşündürmektedir. PPAR $\gamma$ 'daki değişikliklerinin doğrudan VB'ye bağlı olarak değerlendirilmesi uygun olmayacağı ileri sürülmektedir. Ek olarak, in vivo şartların bu LC ekstraktının dolayısıyla etken maddesi olan VB'nin etkisinde değişime neden olabileceği de ön görülmektedir.

Tez çalışmamızda ayrıca lipid metabolizması da araştırılmış ve yağ dokuda lipoliz mekanizmasında rol alan iki molekülün mRNA ekspresyonları değerlendirilmiştir. Bunlarda ilki olan HSL'nin, V50 grubunda kontrol grubuna göre ve V100 grubunda da kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer parametre olan PLIN1 mRNA ekspresyonu da benzer şekilde V50 ve V100 gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. Her iki parametrenin de V50 ve V100 gruplarının ikili karşılaştırmalarında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Lipolize aracılık eden en iyi bilinen mekanizma cAMP yoludur. Hücre içi cAMP seviyelerinde ortaya çıkan artış, cAMP'ye bağlı bir protein kinaz olan PKA'nın aktivasyonuna yol açar. HSL ve PLIN1, PKA tarafından fosforile edilir ve bu,

trigliseridlerin katalizlenmesine ve digliseridlerin parçalanmasına daha sonra da FA ve gliserol salınımına yol açar (185,186). Perilipinlerin işlevi, bazal koşullarda (istirahat, tokluk vb) lipolizi engelleyerek lipid birikimini desteklemektir ancak uyarı (soğuk, açlık, egzersiz vb) ile HSL, LD yüzeyine geçtiğinde, enzim etkisine bir bariyer görevi gören perilipinler fosforile olarak bloke etme yeteneklerini kaybederler (187). TAG'ın yağ dokusunda depolanmasını en üst düzeye çıkarmak için perilipinler gereklidir. Lipid damlacığı ile ilişkili protein olarak da bilinen PLIN1, insanlarda PLIN geni tarafından kodlanan bir proteindir (188).

Perilipin nakavt farelerde, yapısal bir şekilde azaltılmış yağ dokusu kütlesi ve yüksek seviyelerde bazal lipoliz olduğu görülmüştür (120,189). Bu fareler, kontrol fareleri ile karşılaştırıldığında diyetle indüklenen obeziteye dirençli oldukları gösterilmiştir. Ayrıca perilipin fonksiyonunu değerlendirmek için yapılan bir araştırmada, normalde perilipin içermeyen 3T3-L1 preadipositlerinde perilipinin ektopik ekspresyonu ile, sitoplazmada çok sayıda LD üretildiği ve bu LD yüzeyinde lokalize olan perilipinlerin, depolanmış TAG birikintilerinin yarı ömrünü arttırdığı ve kontrol hücrelerine göre 6-30 kat daha fazla TAG depolanmasına neden olduğu raporlanmıştır (119). Bu verilerle birlikte ele alındığında çalışmamızda kullandığımız 3T3-L1 hücre hattının hipertrofik hale gelme sürecinde yağ damlacığı sayısının artmaktadır. Bununla ilişkili olarak yine PLIN1 mRNA ekspresyon düzeyi de artmıştır ve iki durumun birbiriyle eş zamanlı olması PLIN1'in bu sürece katkısı olabilir şeklinde yorumlanabilir.

Aynı zamanda PLIN1'in, PPAR $\gamma$  için bir hedef gen olduğu bulunmuştur (190). 3T3-L1 adipositlerinin bir PPAR $\gamma$  agonisti ile tedavisi, PLIN gen ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Perilipin, promotor bölgesinde PPAR $\gamma$ 'ya duyarlı bir elemana sahiptir ve PPAR $\gamma$ 2, PPAR ailesinin tüm üyeleri arasında en güçlü regülatörü olarak bilinmektedir (191). PPAR $\gamma$ 'nın PLIN ekspresyonunu uyararak trigliserid birikiminde bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (192). Çalışmamızda bu anlamda literatürdeki tüm bu bilgilerle uyumlu olarak PPAR $\gamma$  ve PLIN1 ekspresyonlarında artış saptanmıştır. Bu durumun 3T3-L1 preadipositlerini diferansiye ederek oluşturduğumuz hipertrofi modelinin bir sonucu olarak ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Ayrıca hipertrofi oluşumu nedeniyle yağ damlacıkları sayısı artmış böylece etrafında lokalize olan ve

LD stabilitesini sağlayan PLIN1 ekspresyonu da artmış olarak saptanmıştır ve bu durumun PPAR $\gamma$  artışı ile uyumlu olabileceğini ileri sürmekteyiz.

Tüm bunların yanı sıra literatür incelendiğinde VB uygulamasının PLIN1 ve HSL üzerine etkilerinin gösterildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yakın bir zamanda yapılan bir araştırmada polifenol bakımından zengin bir ekstraktın anti-adipojenik etkileri ve altta yatan moleküler mekanizmaları farklılaşmış 3T3-L1 adipoz hücrelerinde incelenmiş, ekstrakt ile tedavinin, adipositlerde lipid birikimini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Aynı zamanda RT-PCR analizi sonucu, ekstrenin, PPAR $\gamma$  (% 67), HSL (% 39) ve PLIN1 (% 32) gen ekspresyonunu azaltarak adipogenez ve lipogenez baskıladığı gösterilmiştir (193). Ancak çalışmamızda PPAR $\gamma$  ve PLIN1 artmasına rağmen HSL'de de artış gözlenmiştir. Bu sonuç lipid damlacıklarının artışının indüklenmesinin yanında uyguladığımız VB ile lipolizin de artmış olabileceği yönünde yorumlanabilir.

Aynı zamanda başka bir polifenol olan Timol'un 3T3-L1 hücrelerinde kahverengileşme etkilerinin, bu konuda etkisi iyi bilinen bir kokteyl (50 nM triidotironin ve 1  $\mu$ M rosiglitazon) ile karşılaştırıldığı başka bir çalışmada; Timol hem pAMPK ekspresyon seviyelerini ve hem de pAMPK / AMPK oranını önemli ölçüde arttırmıştır. Bununla beraber HSL, PLIN ve PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  ve PPAR $\gamma$  protein düzeyleri pozitif kontrole kıyasla, Timol uygulanan grupta anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (151). Bu durum Timolün lipolizi arttırıp, adipositlerde kahverengileşmeyi indüklediğini destekler niteliktedir.

Çalışmamızda kullandığımız polifenol ile de bu çalışmalarla uyumlu olarak, hipertrofik hale getirilmiş 3T3-L1 hücrelerinde VB uygulamasıyla PPAR $\gamma$ , PLIN1 ve HSL mRNA ekspresyon seviyelerinde artış saptanmıştır. Her ne kadar perilipinler LD ilişkili proteinler olarak bilinse de PLIN1 gen ekspresyonu artışı lipoliz lehine yorumlanarak VB'nin lipolizi arttırıcı etkisine aracılık ettiği savımızı destekler niteliktedir.

Çalışmamız sonucu mikrodizin analizinde V50/kontrol (1,52 kat) ve V100/kontrol (1,53 kat) artış gösteren Ifi202b geni için yapılan RT-PCR sonucu da mRNA ekspresyonu V50 ve V100 gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak



anlamli derecede artiş tespit edilmiştir. V50 ve V100 gruplarının arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

Ifi202b kısmen yeni tanımlanmış bir gen olup bu açıdan literatürde kısıtlı sayıda veri bulunmaktadır. Ifi202b ve insan ortologu IFI16 da p200 ailesine aittir, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozis ve inflamasyonun transkripsiyonel modülatörleri olarak bilinmektedir (194,195). Yakın zamanda pozisyonel klonlama tekniği ile Ifi202b bir obezite geni olarak tanımlanmıştır (196).

Murin interferon ile indüklenebilir p200 protein ailesi, p202 (p202a olarak da adlandırılır) ve alternatif olarak eklenmiş varyantları p202b, p202c, p203, p204 ve p205, *absent in melanoma* (AIM2) olarak bulunur, birçok dokuda eksprese edilir ve ilişkili dokuya özgü karakteristikleri tanımlanmıştır (194).

3T3-L1 preadipositleri ile Ifi202b ekspresyonu incelenen literatürde yalnızca bir çalışma bulunmaktadır. Ifi202b ve IFI16'nın adipogenez üzerindeki etkisinin, murin 3T3-L1 hücreleri, insan Simpson-Golabi-Behmel sendromu (SGBS) preadipositleri ve Ifi202b'yi overeksprese eden transgenik farelerde ilgili ekspresyonlarını araştırılmıştır. Farelerde, Ifi202b'nin aşırı ekspresyonunun, hipertrofik yağ kütlesi artışı ve obeziteye aynı zamanda beyaz yağ doku selektif genlerinde artışa ve termojenik genlerin ekspresyonunun azalmasına (örneğin Cidea, UCP-1) neden olduğu gösterilmiştir (197). Ifi202b aşırı eksprese eden hücrelerde farklılaşma sonrası 32, 72 saat sonra değerlendirilen PPAR $\gamma$  ekspresyonu ve 72 saat sonra bakılan PLIN1 ekspresyonu artmış olarak bulunmuştur. Beklendiği gibi, 3T3-L1 preadipositlerinde Ifi202b'nin baskılanması da adiposite özgü transkriptlerin (PPAR $\gamma$ , PLIN1) ekspresyonunun azalmasına ve TAG seviyelerinde bir düşüşe neden olmuştur. Sonuç olarak araştırmacılar bu genlerin beyaz adipogenezini uyararak obezite ile ilişkili IR gelişmesini kolaylaştırdığını belirtmişlerdir (197). Ifi202b mRNA seviyeleri adipogenez sırasında belirgin şekilde artmış, farklılaşma kokteyli uygulandıktan 24 saat sonra maksimuma ulaşmış ve zamanla azalarak olgun adipositlerde (7.gün) en düşük seviyelerde görülmüştür, bu durum da Ifi202b ekspresyonunun, adiposit farklılaşmasının erken aşamalarında arttığı yönünde yorumlanmıştır. Çalışmamızda Stadion ve ark. ile uyumlu olarak Ifi202b artarken aynı zamanda PPAR $\gamma$ , PLIN1 ekspresyonunun da arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte çalışmamızda hipertrofik adipositlere VB

uygulanması sonrası gen ekspresyonları değerlendirilmiş olup; bu nedenle çalışmamız Ifi202b ifadesinin 20.günde de arttığını gösteren literatürdeki tek ve ilk çalışma olma özelliğindedir. Bu genin ifadesinin farklılaşma sonrası tüm süreçte nasıl değiştiği, uygulanan VB sonrası mı yoksa bu süreç nedeniyle mi gen ifadesinde artış görüldüğü ve buradaki rolünün ileri araştırmalarla desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde 3T3-L1 hücre hattı dışında Ifi202b geni ve protein ürünü olan p202'nin adiposit farklılaşmasına etkilerinin incelendiği sadece iki adet çalışma bulunmakta olup; bu çalışmalar da bulgularımızı destekler niteliktedir.

P202'nin adiposit farklılaşmasındaki rolünü araştırmak için, fare adipoz türevli kök hücrelerin (mASC, *mouse adipose-derived stem cells*) farklılaştırılmasında p202 mRNA ve protein seviyelerinin incelendiği bir çalışmada ise; mASC'nin adipogenezi sırasında sürekli olarak arttığı gösterilerek p202'nin supresyonu ve aşırı ekspresyonu sırasıyla farklılaşma sürecini bozmuş ve güçlendirmiştir. Ayrıca bu çalışma hücrelerin ara ve / veya geç farklılaşma aşamalarında p202'nin C / EBP $\beta$ , C / EBP $\alpha$  ve PPAR $\gamma$  ile etkileşimini göstermiştir ve over ekspresyonunun mASC adipogenezinde rol alan transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırarak ve adiposit diferansiasyonu sırasında gerekli ve önemli bir rol oynadığına dair kanıt sağlamıştır (198).

Murin interferon ile indüklenebilir protein ailesi üyesi olan AIM2'nin enerji metabolizmasında ve glikoz homeostazındaki rolünün değerlendirildiği yeni yapılan başka bir araştırma sonucu ise; farelerde AIM2 delesyonunun adipogenezi indükleyerek her iki cinstede spontan obezite ve IR geliştirdiği, ayrıca bu farelerin bozulmuş kahverengi yağ dokusu fonksiyonu, azalmış termogenez gösterdiği bildirilmiştir (199). AIM2 delesyonlu farelerdeki artan adipogenez ve inflamasyonu, p202'nin upregülasyonu aracılığıyla gerçekleştiği, p202 geni olan Ifi202b'nin nakavtı ile farelerin iBYD'dan izole edilen stromal vasküler fraksiyonlarında adipogenezi bloke ettiği raporlanmıştır (199). Aynı çalışmada Ifi202b'nin insan homologu olan IFI16'nın 33 okul çağındaki çocuğun scBYD'da mRNA seviyesinin, VKİ ile pozitif korelasyon gösterdiği ve fazla kilolu ve obez çocuklarda, normal kilolu çocuklardan önemli ölçüde daha yüksek IFI16 ekspresyonu gösterilmiştir.

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, Ifi202b ve p202'nin obezite, IR'deki rolü vurgulanmakta, dolayısıyla metabolik bozuklukların tedavisi için yeni

moleküler hedefler olarak belirtilmektedir. Bu iki çalışmanın sonuçları birbirleriyle uyumlu olarak; Ifi202b'nin adipogenez üzerine pozitif etkisi olabileceğini göstermektedir. Deney gruplarımızda görülen Ifi202b'deki artışın sebebinin VB'nin hücrelerin proliferasyonu artırma yönünde etki etmesinden kaynaklı ve bu çoğalmaya cevaben ortaya çıkmış olabileceğini ileri sürmekteyiz.

Literatürdeki çalışmalar beraber incelendiğinde; 3T3-L1 hücrelerin farklılaştırma sürecinde kullanılan besi yerleri ve buradaki kimyasalların, serumların türlerinin, konsantrasyonlarının değişkenlik gösterdiği; aynı zamanda farklılaştırma süreleri açısından da pek çok farklı protokol uygulandığı gözlenmiştir. Bir diğer değişken ise polifenol uygulanan hücrelerin türü ya da aynı hücre olsa dahi bileşiğin hangi günlerde, ne kadar süreyle uygulandığı, saf ya da bitki ekstraktından elde edilmesi de birbiriyle farklılık göstermektedir ve çalışmamızın literatürle değerlendirmesi açısından tüm bunlar sınırlandırıcı faktörler olarak değerlendirilmiştir.

Farklı doz ve sürelerin denenerek aynı zamanda bu yolaklardaki diğer transkripsiyon faktörleri ile de bu etkilerin desteklenip, sonuçların bu şekilde yorumlanarak ortaya çıkarılması gerekmektedir. Böylece VB'nin antiobezite etkinliğini ve bunun obeziteyle mücadelede ilaç olarak geliştirilme potansiyelini değerlendirmek için bizlere yol gösterici olabilecektir.

## SONUÇLAR

3T3-L1 preadipositlerine uygulanan farklılaşma protokolü ve takiben 18 gün boyunca indüklenerek oluşturulan hipertrofik adipositlere 48 saat süreyle 50 µM ve 100 µM *Verbascoside* uygulanarak oluşturulan deney gruplarında;

1. Oil Red O boyama sonucunda hücrelerin maturasyonu ve hipertrofisi ile hücre içi lipid birikimi olduğu gösterilmiştir. Ancak VB uygulanan gruplar arasında lipid birikiminde kalitatif açıdan bir farklılık gözlenmemiştir.
2. Mikrodizin analizinde kahverengileşmede rol alan genlerde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmamıştır.
3. Mikrodizin analizinde her iki grupta kontrole göre Ifi202b geninde anlamlı artış görülmüştür.
4. *Verbascoside* AMPK mRNA ekspresyonunu, V50 ve V100 grubunda kontrole göre, V100 grubunda da V50 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır.
5. *Verbascoside* PPAR $\gamma$  mRNA ekspresyonunu, V50 ve V100 grubunda kontrole göre, V100 grubunda da V50 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır.
6. *Verbascoside* HSL mRNA ekspresyonunu, V50 grubunda kontrole göre, V100 grubunda da kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı arttırmış ancak V50 ve V100 grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır.
7. *Verbascoside* PLIN1 mRNA ekspresyonunu, V50 ve V100 gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırmıştır. V50 ve V100 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.
8. *Verbascoside* Ifi202b mRNA ekspresyonunu, V50 ve V100 gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırmıştır. V50 ile V100 gruplarının arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

## KAYNAKLAR

1. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JMA, Kalinovich A V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* 2013;5(5):1196-1203. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.044
2. Lo KA, Sun L. Turning WAT into BAT: A review on regulators controlling the browning of white adipocytes. *Biosci Rep.* 2013;33(5):711-719. doi:10.1042/BSR20130046
3. Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(11):691-702. doi:10.1038/nrm.2016.96
4. Vegiopoulos A, Müller-Decker K, Strzoda D, et al. Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science (80- ).* 2010;328(5982):1158-1161. doi:10.1126/science.1186034
5. Concha F, Prado G, Quezada J, et al. Nutritional and non-nutritional agents that stimulate white adipose tissue browning. *Rev Endocr Metab Disord.* 2019;20(2):161-171. doi:10.1007/s11154-019-09495-y
6. González-Castejón M, Rodríguez-Casado A. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacol Res.* 2011;64(5):438-455. doi:10.1016/j.phrs.2011.07.004
7. Sergent T, Vanderstraeten J, Winand J, Beguin P, Schneider YJ. Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. *Food Chem.* 2012;135(1):68-73. doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.074
8. Bonet ML, Oliver P, Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2013;1831(5):969-985. doi:10.1016/j.bbalip.2012.12.002
9. Lee P, Greenfield JR. Non-pharmacological and pharmacological strategies of brown adipose tissue recruitment in humans. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;418:184-190. doi:10.1016/j.mce.2015.05.025
10. Merlin J, Evans BA, Dehvari N, Sato M, Bengtsson T, Hutchinson DS. Could

- burning fat start with a brite spark? Pharmacological and nutritional ways to promote thermogenesis. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(1):18-42. doi:10.1002/mnfr.201500251
11. Azhar Y, Parmar A, Miller CN, Samuels JS, Rayalam S. Phytochemicals as novel agents for the induction of browning in white adipose tissue. *Nutr Metab.* 2016;13(1). doi:10.1186/s12986-016-0150-6
  12. Amiot MJ, Riva C, Vinet A. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: A systematic review. *Obes Rev.* 2016;17(7):573-586. doi:10.1111/obr.12409
  13. Cherniack EP. Polyphenols: Planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition.* 2011;27(6):617-623. doi:10.1016/j.nut.2010.10.013
  14. Herranz-López M, Barrajón-Catalán E, Segura-Carretero A, Menéndez JA, Joven J, Micol V. Lemon verbena (*Lippia citriodora*) polyphenols alleviate obesity-related disturbances in hypertrophic adipocytes through AMPK-dependent mechanisms. *Phytomedicine.* 2015;22(6):605-614. doi:10.1016/j.phymed.2015.03.015
  15. Di Giancamillo A, Rossi R, Pastorelli G, et al. The effects of dietary verbascoside on blood and liver oxidative stress status induced by a high n-6 polyunsaturated fatty acids diet in piglets<sup>12</sup>. *J Anim Sci.* 2015;93(6):2849-2859. doi:10.2527/jas.2014-8607
  16. Sanchez PM, Villarreal ML, Herrera-Ruiz M, Zamilpa A, Jiménez-Ferrer E, Trejo-Tapia G. In vivo anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of extracts from wild growing and in vitro plants of *Castilleja tenuiflora* Benth. (Orobanchaceae). *J Ethnopharmacol.* 2013;150(3):1032-1037. doi:10.1016/j.jep.2013.10.002
  17. Aitlhadj L, Ávila DS, Benedetto A, Aschner M, Stürzenbaum SR. Environmental exposure, obesity, and parkinson's disease: Lessons from fat and old worms. *Environ Health Perspect.* 2011;119(1):20-28. doi:10.1289/ehp.1002522

18. Price NL, Singh AK, Rotllan N, et al. Genetic Ablation of miR-33 Increases Food Intake, Enhances Adipose Tissue Expansion, and Promotes Obesity and Insulin Resistance. *Cell Rep.* 2018;22(8):2133-2145. doi:10.1016/J.CELREP.2018.01.074
19. Obesity and overweight. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Erişim Tarihi: 1 Mart 2021.
20. Defining Adult Overweight and Obesity | Overweight & Obesity | CDC. <https://www.cdc.gov/obesity/adult/defining.html> Erişim Tarihi: 1 Mart 2021.
21. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, et al. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol.* 2013;28(2):169-180. doi:10.1007/s10654-013-9771-5
22. Torres-Fuentes C, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. A natural solution for obesity: Bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. *Nutr Neurosci.* 2015;18(2):49-65. doi:10.1179/1476830513Y.0000000099
23. Kuryłowicz A. Induction of Adipose Tissue Browning as a Strategy to Combat Obesity. Published online 2020.
24. Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359. doi:10.1152/physrev.00015.2003
25. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. *Arch Med Sci.* 2013;9(2):191-200. doi:10.5114/aoms.2013.33181
26. Stanford KI, Middelbeek RJW, Goodyear LJ. Exercise effects on white adipose tissue: Beiging and metabolic adaptations. *Diabetes.* 2015;64(7):2361-2368. doi:10.2337/db15-0227
27. Keipert S, Jastroch M. Brite/beige fat and UCP1 - Is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2014;1837(7):1075-1082. doi:10.1016/j.bbabbio.2014.02.008

28. Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex.* 2020;156(2):142-149. doi:10.24875/GMM.M20000356
29. Roman S, Agil A, Peran M, et al. Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Transl Res.* 2015;165(4):464-479. doi:10.1016/j.trsl.2014.11.002
30. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001;60(3):329-339. doi:10.1079/pns200194
31. Vázquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Arch Med Res.* 2008;39(8):715-728. doi:10.1016/j.arcmed.2008.09.005
32. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol.* 2008;216(1):3-13. doi:10.1002/jcp.21386
33. Jones G. Fifty shades of brown. *Tunnels Tunn Int.* 2012;126(DEC):43-47. doi:10.1161/circulationaha.112.123521
34. Rezaee F, Dashty M. Role of Adipose Tissue in Metabolic System Disorders Adipose Tissue is the Initiator of Metabolic Diseases. Published online 2013. doi:10.4172/2155-6156.S13-008
35. Enerbäck S. Human Brown Adipose Tissue. *Cell Metab.* 2010;11(4):248-252. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.008
36. Lean MEJ. Brown adipose tissue in humans. *Proc Nutr Soc.* 1989;48(2):243-257. doi:10.1079/pns19890036
37. Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. *Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans A BS TR AC T.* Vol 360.; 2009. <http://faculty>.
38. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293:444-



452. doi:10.1152/ajpendo.00691.2006.-The
39. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: Effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes*. 2009;58(7):1526-1531. doi:10.2337/db09-0530
  40. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommelrig JW, Smulders NM, et al. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N Engl J Med*. 2009;360(15):1500-1508. doi:10.1056/nejmoa0808718
  41. Virtanen KA, Al. E. a 1518. *N Engl J Med*. Published online 2009.
  42. Heaton JM. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat*. 1972;112(Pt 1):35-39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5086212><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1271341>
  43. Lidell ME, Betz MJ, Leinhard OD, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med*. 2013;19(5):631-634. doi:10.1038/nm.3017
  44. Ravussin E, Galgani JE. The implication of brown adipose tissue for humans. *Annu Rev Nutr*. 2011;31:33-47. doi:10.1146/annurev-nutr-072610-145209
  45. Algire C, Medrikova D, Herzig S. White and brown adipose stem cells: From signaling to clinical implications. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2013;1831(5):896-904. doi:10.1016/j.bbalip.2012.10.001
  46. Sidossis L, Kajimura S. Brown and beige fat in humans: Thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2015;125(2):478-486. doi:10.1172/JCI78362
  47. Chouchani ET, Kajimura S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nat Metab*. 2019;1(2):189-200. doi:10.1038/s42255-018-0021-8
  48. Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest*. 2012;122(3):1022-1036. doi:10.1172/JCI59701

49. Jun H, Yu H, Gong J, et al. An immune-beige adipocyte communication via nicotinic acetylcholine receptor signaling. *Nat Med*. 2018;24(6):814-822. doi:10.1038/s41591-018-0032-8
50. Collins S.  $\beta$ -Adrenoceptor signaling networks in adipocytes for recruiting stored fat and energy expenditure. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3(JAN). doi:10.3389/fendo.2011.00102
51. Zafrir B. Brown adipose tissue: Research milestones of a potential player in human energy balance and obesity. *Horm Metab Res*. 2013;45(11):774-785. doi:10.1055/s-0033-1348264
52. Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes*. 2010;34(1):S36-S42. doi:10.1038/ijo.2010.182
53. Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc*. 2001;60(3):319-328. doi:10.1079/pns200192
54. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, et al. Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. *Obesity*. 2011;19(9):1755-1760. doi:10.1038/oby.2011.125
55. Lee P, Swarbrick MM, Ho KKY. Brown adipose tissue in adult humans: A metabolic renaissance. *Endocr Rev*. 2013;34(3):413-438. doi:10.1210/er.2012-1081
56. Wang Q, Zhang M, Xu M, et al. Brown adipose tissue activation is inversely related to central obesity and metabolic parameters in adult human. *PLoS One*. 2015;10(4). doi:10.1371/journal.pone.0123795
57. Poekes L, Lanthier N, Leclercq IA. Brown adipose tissue: A potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. *Clin Sci*. 2015;129(11):933-949. doi:10.1042/CS20150339
58. Tiraby C, Langin D. Conversion from white to brown adipocytes: A strategy for the control of fat mass? *Trends Endocrinol Metab*. 2003;14(10):439-441. doi:10.1016/j.tem.2003.10.001

59. Giordano A, Frontini A, Cinti S. Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(6):405-424. doi:10.1038/nrd.2016.31
60. Abdullahi A, Jeschke MG. White Adipose Tissue Browning: A Double-edged Sword. *Trends Endocrinol Metab.* 2016;27(8):542-552. doi:10.1016/j.tem.2016.06.006
61. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes \* □ S. Published online 2010. doi:10.1074/jbc.M109.053942
62. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 2013;19(10):1252-1263. doi:10.1038/nm.3361
63. Park A. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2014;6(1):33. doi:10.4252/wjsc.v6.i1.33
64. Wu J, Boström P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012;150(2):366-376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.016
65. Stanford KI, Middelbeek RJW, Townsend KL, et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest.* 2013;123. doi:10.1172/JCI62308DS1
66. Bostrom P et al. A PGC1 $\alpha$ -dependent myokine that drives browning of white fat. 2012;481(7382):463-468. doi:10.1038/nature10777.A
67. Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res.* 2012;53(4):619-629. doi:10.1194/jlr.M018846
68. Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S.

- Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2000;279(3 48-3):670-681. doi:10.1152/ajpcell.2000.279.3.c670
69. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2010;298(6):1244-1253. doi:10.1152/ajpendo.00600.2009
  70. Ikeda K, Maretich P, Kajimura S. The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*. 2018;29(3):191-200. doi:10.1016/j.tem.2018.01.001
  71. Seale P, Bjork B, Yang W, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008;454(7207):961-967. doi:10.1038/nature07182
  72. Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by  $\beta$ 3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell Metab*. 2012;15(4):480-491. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.009
  73. Frontini A, Cinti S. Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. *Cell Metab*. 2010;11(4):253-256. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.004
  74. Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, 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 Metab*. 2012;16(3):348-362. doi:10.1016/j.cmet.2012.08.003
  75. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*. 2006;4(4):263-273. doi:10.1016/j.cmet.2006.07.001
  76. Kajimura S, Seale P, Kubota K, et al. Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP- $\beta$  transcriptional complex. *Nature*. 2009;460(7259):1154-1158. doi:10.1038/nature08262
  77. Carmona MC, Hondares E, Rodriguez De La Concepcion ML, et al. Defective

- thermoregulation, impaired lipid metabolism, but preserved adrenergic induction of gene expression in brown fat of mice lacking C/EBP $\beta$ . *Biochem J.* 2005;389(1):47-56. doi:10.1042/BJ20050009
78. Karamanlidis G, Karamitri A, Docherty K, Hazlerigg DG, Lomax MA. C/EBP $\beta$  reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a brown adipocyte pattern of gene expression. *J Biol Chem.* 2007;282(34):24660-24669. doi:10.1074/jbc.M703101200
  79. Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene. *EMBO J.* 1997;16(24):7432-7443. doi:10.1093/emboj/16.24.7432
  80. Kajimura S, Saito M. A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. *Annu Rev Physiol.* 2014;76(1):225-249. doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170252
  81. Wu J, Boström P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012;150(2):366-376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.016
  82. Wankhade UD, Shen M, Yadav H, Thakali KM. Novel Browning Agents, Mechanisms, and Therapeutic Potentials of Brown Adipose Tissue. *Biomed Res Int.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/2365609
  83. Wang X, Wahl R. Responses of the Insulin Signaling Pathways in the Brown Adipose Tissue of Rats following Cold Exposure. Randeva HS, ed. *PLoS One.* 2014;9(6):e99772. doi:10.1371/journal.pone.0099772
  84. Vosselman MJ, Hoeks J, Brans B, et al. Low brown adipose tissue activity in endurance-trained compared with lean sedentary men. *Int J Obes.* 2015;39(12):1696-1702. doi:10.1038/ijo.2015.130
  85. Symonds ME. Brown Adipose Tissue Growth and Development. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:1-14. doi:10.1155/2013/305763
  86. Kiefer FW, Vernochet C, O'Brien P, et al. Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue. *Nat Med.*

2012;18(6):918-925. doi:10.1038/nm.2757

87. Rosenwald M, Perdikari A, Rüllicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. Published online 2013. doi:10.1038/ncb2740
88. van Dam AD, Kooijman S, Schilperoort M, Rensen PCN, Boon MR. Regulation of brown fat by AMP-activated protein kinase. *Trends Mol Med.* 2015;21(9):571-579. doi:10.1016/j.molmed.2015.07.003
89. Zhang X, Li X, Fang H, et al. Flavonoids as inducers of white adipose tissue browning and thermogenesis: Signalling pathways and molecular triggers. *Nutr Metab.* 2019;16(1):1-15. doi:10.1186/s12986-019-0370-7
90. Mulligan JD, Gonzalez AA, Stewart AM, Carey H V., Saupe KW. Upregulation of AMPK during cold exposure occurs via distinct mechanisms in brown and white adipose tissue of the mouse. *J Physiol.* 2007;580(2):677-684. doi:10.1113/jphysiol.2007.128652
91. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell.* 1998;92(6):829-839. doi:10.1016/S0092-8674(00)81410-5
92. Nemoto K, Sato KI. A 2.5PPM fully integrated CMOS analog TCXO. *Proc Annu IEEE Int Freq Control Symp.* 2001;98:740-743. doi:10.1109/freq.2001.956373
93. Tiraby C, Tavernier G, Lefort C, et al. Acquisition of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(35):33370-33376. doi:10.1074/jbc.M305235200
94. Lin J, Wu PH, Tarr PT, et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 $\alpha$  null mice. *Cell.* 2004;119(1):121-135. doi:10.1016/j.cell.2004.09.013
95. Uldry M, Yang W, St-Pierre J, Lin J, Seale P, Spiegelman BM. Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* 2006;3(5):333-341.

doi:10.1016/j.cmet.2006.04.002

96. Kleiner S, Mepani RJ, Laznik D, et al. Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1 $\alpha$  in adipose tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(24):9635-9640. doi:10.1073/pnas.1207287109
97. Suwa M, Nakano H, Kumagai S. First published May 30. *J Appl Physiol*. 2003;95:960-968. doi:10.1152/jappphysiol.00349.2003.-This
98. Jäer S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(29):12017-12022. doi:10.1073/pnas.0705070104
99. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009;458(7241):1056-1060. doi:10.1038/nature07813
100. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. In: *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol 93. American Society for Nutrition; 2011:884S. doi:10.3945/ajcn.110.001917
101. Qiang L, Wang L, Kon N, et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Pparg. *Cell*. 2012;150(3):620-632. doi:10.1016/j.cell.2012.06.027
102. Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR $\gamma$ : A Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *J Biol Chem*. 2001;276(41):37731-37734. doi:10.1074/jbc.R100034200
103. Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, et al. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem*. 1996;271(2):611-614. doi:10.1074/jbc.271.2.611
104. Thornton C, Snowden MA, Carling D. Identification of a novel AMP-activated protein kinase  $\beta$  subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1998;273(20):12443-12450. doi:10.1074/jbc.273.20.12443

105. Cheung PCF, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase  $\gamma$ -subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J.* 2000;346(3):659-669. doi:10.1042/0264-6021:3460659
106. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: The diverse biology of PPAR $\gamma$ . *Annu Rev Biochem.* 2008;77:289-312. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829
107. Vernochet C, Peres SB, Davis KE, et al. C/EBP $\alpha$  and the Corepressors CtBP1 and CtBP2 Regulate Repression of Select Visceral White Adipose Genes during Induction of the Brown Phenotype in White Adipocytes by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Agonists. *Mol Cell Biol.* 2009;29(17):4714-4728. doi:10.1128/mcb.01899-08
108. Ohno H, Shinoda K, Spiegelman BM, Kajimura S. PPAR $\gamma$  agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab.* 2012;15(3):395-404. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.019
109. Walczak R, Tontonoz P. Setting fat on fire. *Nat Med.* 2003;9(11):1348-1349. doi:10.1038/nm1103-1348
110. Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR $\gamma$ 2 versus PPAR $\gamma$ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem.* 1997;272(12):8071-8076. doi:10.1074/jbc.272.12.8071
111. Rachid TL, Penna-de-Carvalho A, Bringhenti I, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. PPAR- $\alpha$  agonist elicits metabolically active brown adipocytes and weight loss in diet-induced obese mice. *Cell Biochem Funct.* 2015;33(4):249-256. doi:10.1002/cbf.3111
112. Wang YX, Lee CH, Tjep S, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor  $\delta$  activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell.* 2003;113(2):159-170. doi:10.1016/S0092-8674(03)00269-1
113. Duarte FO, Sene-Fiorese M, Manzoni MSJ, et al. Caloric restriction and



- refeeding promoted different metabolic effects in fat depots and impaired dyslipidemic profile in rats. *Nutrition*. 2008;24(2):177-186. doi:10.1016/j.nut.2007.10.012
114. Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*. 2001;2(4):282-286. doi:10.1093/embo-reports/kve071
  115. Kimmel AR, Brasaemle DL, McAndrews-Hill M, Sztalryd C, Londos C. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J Lipid Res*. 2010;51(3):468-471. doi:10.1194/jlr.R000034
  116. Kimmel AR, Sztalryd C. The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet-Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis. *Annu Rev Nutr*. 2016;36:471-509. doi:10.1146/annurev-nutr-071813-105410
  117. Itabe H, Yamaguchi T, Nimura S, Sasabe N. Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins. *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):1-11. doi:10.1186/s12944-017-0473-y
  118. Tansey JT, Huml AM, Vogt R, et al. Functional studies on native and mutated forms of perilipins: A role in protein kinase  $\alpha$ -mediated lipolysis of triacylglycerols in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 2003;278(10):8401-8406. doi:10.1074/jbc.M211005200
  119. Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Londos C. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem*. 2000;275(49):38486-38493. doi:10.1074/jbc.M007322200
  120. Martinez-Botas J, Anderson JB, Tessier D, et al. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat Genet*. 2000;26(4):474-479. doi:10.1038/82630
  121. Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and

- resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6494-6499. doi:10.1073/pnas.101042998
122. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res*. 2009;50(1):3-21. doi:10.1194/jlr.R800031-JLR200
  123. Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S, Osumi T. CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets: Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem*. 2004;279(29):30490-30497. doi:10.1074/jbc.M403920200
  124. Yamaguchi T, Omatsu N, Morimoto E, et al. CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J Lipid Res*. 2007;48(5):1078-1089. doi:10.1194/jlr.M600493-JLR200
  125. Sztalryd C, Brasaemle DL. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2017;1862(10):1221-1232. doi:10.1016/j.bbali.2017.07.009
  126. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974;3(2):127-133. doi:10.1016/0092-8674(74)90116-0
  127. Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell*. 1976;7(1):105-113. doi:10.1016/0092-8674(76)90260-9
  128. Poulos SP, Dodson M V., Hausman GJ. Cell line models for differentiation: Preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med*. 2010;235(10):1185-1193. doi:10.1258/ebm.2010.010063
  129. Armani A, Mammi C, Marzolla V, et al. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *J Cell Biochem*. 2010;110(3):564-572. doi:10.1002/jcb.22598
  130. Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro M-C. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis.

- FASEB J.* 2007;21(9):2185-2194. doi:10.1096/fj.06-7970com
131. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(12):885-896. doi:10.1038/nrm2066
  132. Otto TC, Lane MD. Adipose development: From stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2005;40(4):229-242. doi:10.1080/10409230591008189
  133. Hishida T, Nishizuka M, Osada S, Imagawa M. The role of C/EBP $\delta$  in the early stages of adipogenesis. *Biochimie.* 2009;91(5):654-657. doi:10.1016/j.biochi.2009.02.002
  134. Tung YC, Hsieh PH, Pan MH, Ho CT. Cellular models for the evaluation of the antiobesity effect of selected phytochemicals from food and herbs. *J Food Drug Anal.* 2017;25(1):100-110. doi:10.1016/j.jfda.2016.10.018
  135. Torti FM, Dieckmann B, Beutler B, Cerami A, Ringold GM. A macrophage factor inhibits adipocyte gene expression: An in vitro model of cachexia. *Science (80- ).* 1985;229(4716):867-869. doi:10.1126/science.3839597
  136. Torti FM, Torti S V., Larrick JW, Ringold GM. Modulation of adipocyte differentiation by tumor necrosis factor and transforming growth factor beta. *J Cell Biol.* 1989;108(3):1105-1113. doi:10.1083/jcb.108.3.1105
  137. Xing H, Northrop JP, Russell Grove J, Kilpatrick KE, Jui-Lan SU, Ringold GM. TNF $\alpha$ -mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPAR $\gamma$  without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology.* 1997;138(7):2776-2783. doi:10.1210/endo.138.7.5242
  138. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:715-736. doi:10.1146/annurev-biochem-052110-115718
  139. Korkina LG. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: From plant defense to human health. *Cell Mol Biol.* 2007;53(1):15-25. doi:10.1170/T772
  140. Silvester AJ, Aseer KR, Yun JW. Dietary polyphenols and their roles in fat browning. *J Nutr Biochem.* 2019;64:1-12. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.09.028

141. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998;56(11):317-333. doi:10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x
142. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010;2(12):1231-1246. doi:10.3390/nu2121231
143. Boccellino M, D'angelo S. Anti-obesity effects of polyphenol intake: Current status and future possibilities. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):1-24. doi:10.3390/ijms21165642
144. Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A. Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2014;13(2):155-171. doi:10.1111/1541-4337.12049
145. Guo H, Ling W. The update of anthocyanins on obesity and type 2 diabetes: Experimental evidence and clinical perspectives. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015;16(1). doi:10.1007/s11154-014-9302-z
146. Um JH, Park SJ, Kang H, et al. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes.* 2010;59(3):554-563. doi:10.2337/db09-0482
147. Wang S, Liang X, Yang Q, et al. Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)  $\alpha$ 1. *Int J Obes.* 2015;39(6):967-976. doi:10.1038/ijo.2015.23
148. Andrade JMO, Frade ACM, Guimarães JB, et al. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *Eur J Nutr.* 2014;53(7):1503-1510. doi:10.1007/s00394-014-0655-6
149. Lone J, Choi JH, Kim SW, Yun JW. Curcumin induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 and primary white adipocytes. *J Nutr Biochem.* 2016;27:193-202. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.09.006

150. Kim SW, Choi JH, Mukherjee R, Hwang KC, Yun JW. Proteomic identification of fat-browning markers in cultured white adipocytes treated with curcumin. *Mol Cell Biochem.* 2016;415(1-2):51-66. doi:10.1007/s11010-016-2676-3
151. Choi JH, Kim SW, Yu R, Yun JW. Monoterpene phenolic compound thymol promotes browning of 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Nutr.* 2017;56(7):2329-2341. doi:10.1007/s00394-016-1273-2
152. Wu L, Georgiev MI, Cao H, et al. Therapeutic potential of phenylethanoid glycosides: A systematic review. *Med Res Rev.* 2020;(July):1-45. doi:10.1002/med.21717
153. Jiménez C, Riguera R. Phenylethanoid glycosides in plants: Structure and biological activity. *Nat Prod Rep.* 1994;11(6):591-606. doi:10.1039/NP9941100591
154. Pennacchio M, Syah YM, Ghisalberti EL, Alexander E. Cardioactive compounds from *Eremophila* species. *J Ethnopharmacol.* 1996;53(1):21-27. doi:10.1016/0378-8741(96)01422-5
155. Pastorelli G, Rossi R, Corino C. Influence of *Lippia citriodora* verbascoside on growth performance, antioxidant status, and serum immunoglobulins content in piglets. *Czech J Anim Sci.* 2012;57(7):312-322. doi:10.17221/6006-cjas
156. Alipieva K, Korkina L, Orhan IE, Georgiev MI. Verbascoside - A review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnol Adv.* 2014;32(6):1065-1076. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.07.001
157. Scarpati ML, Monache D. Isolation from *Verbascum sinuatum* of two new glucosides, verbascoside and isoverbascoside. *Ann Chim.* 1963;53:356-367.
158. Birkofer L, Kaiser C, Thomas U. Acteosid und Neoacteosid; Zuckerester aus *Syringa vulgaris* (L.)1,2. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect B J Chem Sci.* 1968;23(8):1051-1058. doi:10.1515/znb-1968-0806
159. Andary C, Wylde R, Laffite C, Privat G, Winternitz F. Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from *Orobanchaceae rapum-genistae*. *Phytochemistry.* 1982;21(5):1123-1127. doi:10.1016/S0031-

9422(00)82429-2

160. Sakurai A, Kato T. A New Glycoside, Kusagin In Isolated from *Clerodendron trichotomum*. *Bull Chem Soc Jpn.* 1983;56(5):1573-1574. doi:10.1246/bcsj.56.1573
161. Wu X, He W, Zhang H, Li Y, Liu Z, He Z. Acteoside: A lipase inhibitor from the Chinese tea *Ligustrum purpurascens* kudingcha. *Food Chem.* 2014;142:306-310. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.071
162. Sánchez-Marzo N, Lozano-Sánchez J, Cádiz-Gurrea M de la L, Herranz-López M, Micol V, Segura-Carretero A. Relationships between chemical structure and antioxidant activity of isolated phytochemicals from lemon verbena. *Antioxidants.* 2019;8(8). doi:10.3390/antiox8080324
163. Olivares-Vicente M, Sánchez-Marzo N, Encinar JA, et al. The potential synergistic modulation of AMPK by *Lippia citriodora* compounds as a target in metabolic disorders. *Nutrients.* 2019;11(12). doi:10.3390/nu11122961
164. Lee YS, Yang WK, Kim HY, et al. Metabolaid® combination of lemon verbena and hibiscus flower extract prevents high-fat diet-induced obesity through AMP-activated protein kinase activation. *Nutrients.* 2018;10(9). doi:10.3390/nu10091204
165. Corbi G, Conti V, Komici K, et al. Phenolic plant extracts induce sirt1 activity and increase antioxidant levels in the rabbit's heart and liver. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/2731289
166. Chemically-Induced Differentiation of ATCC® CL-173™ (3T3-L1) using Single-component Commercially-available Reagents. [https://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical\\_Bulletins/tb09.ashx](https://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical_Bulletins/tb09.ashx) Erişim Tarihi 8 Nisan 2021.
167. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell.* 1975;5(1):19-27. doi:10.1016/0092-8674(75)90087-2
168. Han CY, Kargi AY, Omer M, et al. Differential effect of saturated and

- unsaturated free fatty acids on the generation of monocyte adhesion and chemotactic factors by adipocytes: Dissociation of adipocyte hypertrophy from inflammation. *Diabetes*. 2010;59(2):386-396. doi:10.2337/db09-0925
169. Temizkan G, Arda N. Temel ve ileri moleküler biyoloji yöntemleri genomik ve proteomik analizler. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2017:441-442
170. Butte A. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(12):951-960. doi:10.1038/nrd961
171. Conway T, Schoolnik GK. Microarray expression profiling: Capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol Microbiol*. 2003;47(4):879-889. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03338.x
172. Li X, Gu W, Mohan S, Baylink DJ. DNA microarrays: Their use and misuse. *Microcirculation*. 2002;9(1):13-22. doi:10.1038/sj.mn.7800118
173. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, et al. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans Effects of Cold Exposure and Adiposityorg/licenses/by-nc-nd/3.0/ for details. *1526 DIABETES*. 2009;58. doi:10.2337/db09-0530
174. Symonds ME, Aldiss P, Pope M, Budge H. Recent advances in our understanding of brown and beige adipose tissue: The good fat that keeps you healthy [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*. 2018;7(0):1-8. doi:10.12688/f1000research.14585.1
175. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
176. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013;19(10):1252-1263. doi:10.1038/nm.3361
177. Seale P, Lazar MA. Brown fat in humans: Turning up the heat on obesity. *Diabetes*. 2009;58(7):1482-1484. doi:10.2337/db09-0622
178. Reddy NL, Tan BK, Barber TM, Randeve HS. Brown adipose tissue: Endocrine

- determinants of function and therapeutic manipulation as a novel treatment strategy for obesity. *BMC Obes.* 2014;1(1). doi:10.1186/s40608-014-0013-5
179. Cool B, Zinker B, Chiou W, et al. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* 2006;3(6):403-416. doi:10.1016/j.cmet.2006.05.005
  180. Wu L, Zhang L, Li B, et al. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) regulates energy metabolism through modulating thermogenesis in adipose tissue. *Front Physiol.* 2018;9(FEB). doi:10.3389/fphys.2018.00122
  181. Rodrı C. AMPK modulatory activity of olive – tree leaves phenolic compounds: Bioassay-guided isolation on adipocyte model and in silico approach. Published online 2017:1-22. doi:10.1371/journal.pone.0173074
  182. Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, et al. PPARs and their metabolic modulation: New mechanisms for transcriptional regulation? In: *Journal of Internal Medicine.* Vol 262. J Intern Med; 2007:184-198. doi:10.1111/j.1365-2796.2007.01825.x
  183. Imai T, Takakuwa R, Marchand S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(13):4543-4547. doi:10.1073/pnas.0400356101
  184. Rodriguez Lanzi C, Perdicaro DJ, Landa MS, et al. Grape pomace extract induced beige cells in white adipose tissue from rats and in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem.* 2018;56:224-233. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.03.001
  185. Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC, Londos C. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: Translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(18):8537-8541. doi:10.1073/pnas.89.18.8537
  186. Steinberg D. Hormonal control of lipolysis in adipose tissue. *Adv Exp Med Biol.* 1972;26(0):77-88. doi:10.1007/978-1-4684-7547-0\_6



187. Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10(1):51-58. doi:10.1006/scdb.1998.0275
188. PLIN1 perilipin 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5346> Erişim Tarihi: 5 Nisan 2021.
189. Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J, et al. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(11):6494-6499. doi:10.1073/pnas.101042998
190. Dalen KT, Schoonjans K, Ulven SM, et al. Adipose Tissue Expression of the Lipid Droplet-Associating Proteins S3-12 and Perilipin Is Controlled by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ . *Diabetes.* 2004;53(5):1243-1252. doi:10.2337/diabetes.53.5.1243
191. Arimura N, Horiba T, Imagawa M, Shimizu M, Sato R. The Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Regulates Expression of the Perilipin Gene in Adipocytes. *J Biol Chem.* 2004;279(11):10070-10076. doi:10.1074/jbc.M308522200
192. Carmen GY, Víctor SM. Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal.* 2006;18(4):401-408. doi:10.1016/j.cellsig.2005.08.009
193. Kowalska K, Olejnik A, Szwajgier D, Olkowicz M. Inhibitory activity of chokeberry, bilberry, raspberry and cranberry polyphenol-rich extract towards adipogenesis and oxidative stress in differentiated 3T3-L1 adipose cells. *PLoS One.* 2017;12(11):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0188583
194. Asefa B, Klarmann KD, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Keller JR. The interferon-inducible p200 family of proteins: A perspective on their roles in cell cycle regulation and differentiation. *Blood Cells, Mol Dis.* 2004;32(1):155-167. doi:10.1016/j.bcmed.2003.10.002

195. Choubey D, Duan X, Dickerson E, et al. Interferon-inducible p200-family proteins as novel sensors of cytoplasmic DNA: Role in inflammation and autoimmunity. *J Interf Cytokine Res.* 2010;30(6):371-380. doi:10.1089/jir.2009.0096
196. Vogel H, Scherneck S, Kanzleiter T, et al. Loss of function of Ifi202b by a microdeletion on chromosome 1 of C57BL/6J mice suppresses 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and development of obesity. *Hum Mol Genet.* 2012;21(17):3845-3857. doi:10.1093/hmg/dds213
197. Stadion M, Schwerbel K, Graja A, et al. Increased Ifi202b/IFI16 expression stimulates adipogenesis in mice and humans. *Diabetologia.* 2018;61(5):1167-1179. doi:10.1007/s00125-018-4571-9
198. Li H, Liu F, Guo H, Zhu Z, Jiao Y. Role of interferon-inducible protein 202 (p202) in the regulation of adipogenesis in mouse adipose-derived stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;382(2):814-824. doi:10.1016/j.mce.2013.11.006
199. Gong Z, Zhang X, Su K, et al. Deficiency in AIM2 induces inflammation and adipogenesis in white adipose tissue leading to obesity and insulin resistance. *Diabetologia.* 2019;62(12):2325-2339. doi:10.1007/s00125-019-04983-x