T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BORUN SİRTUİNLER ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL ETKİSİ İLE PROGENİTÖR HÜCRELERDE ADİPOGENEZİN MOLEKÜLER REGÜLASYONU

Ezgi Nur ÇİL
ORCID: 0000-0002-2960-9616

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
Moleküler Tıp Bütünleşik Doktora Programı

DOKTORA TEZİ

İZMİR
HAZİRAN 2025

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2017970232

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BORUN SİRTUİNLER ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL ETKİSİ İLE PROGENİTÖR HÜCRELERDE ADİPOGENEZİN MOLEKÜLER REGÜLASYONU

EZGİ NUR ÇİL
ORCID: 0000-0002-2960-9616

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
Moleküler Tıp Bütünleşik Doktora Programı
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yasemin SOYSAL
ORCID: 0000-0003-1580-0564
İkinci Danışman: Prof. Dr. Sefa KIZILDAĞ
ORCID: 0000-0001-7939-5153

Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2022-2810 ve TÜBİTAK tarafından 222S104 ve 124S255 proje numarası ile desteklenmiştir. Tez yazarı YÖK 100/2000 Doktora Bursu ile Moleküler Patoloji öncelikli alanında ve TÜBİTAK 2211-A Yurt İçi Genel Doktora Bursu ile desteklenmiştir.

İZMİR
HAZİRAN 2025

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum ‘‘Borun Sirtuinler Üzerindeki Potansiyel Etkisi İle Progenitör Hücrelerde Adipogenezin Moleküler Regülasyonu’’ başlıklı doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ezgi Nur ÇİL
Tarih.

TEŞEKKÜR

Öğrenciliğimin ilk gününden itibaren bu zorlu tez sürecinde bana rehberlik eden, b
ve tecrübesi ile gelişimime katkı sağlayan, her konuda sabır ve güler yüzü ile yanı
olup yolumu aydınlatan değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Yasemin Soysal'a,

Kıymetli katkıları için tez izleme komitesindeki hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehtap Yüksel Eğrilmez ve Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Oktay'a ve ikinci tez danışmanın Prof. Dr. Sefa Kızıldağ'a ve Moleküler Tıp ailesine,

Tez çalışmalarımın deneysel sürecinde tüm olanaklarını kullanmamı sağlayan Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'na, destek ve yardımlarını sunan ARLAB ekibine, Dr. Cemre Ural'a, Dr. Zehra Tavşan'a ve iyimserliği ile hep yanımda olan Ayten Darcan'a,

Çalıştığım konu ile ilgili tecrübelerini ve bilgilerini ihtiyaç duyduğumda benimle paylaşan Gebze Teknik Üniversitesi 'nden Dr. Soner Türküner 'e,

Bu araştırmaya destek sağlayan TÜBİTAK ve Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine,

Doktora eğitimim süresince YÖK 100/2000 Doktora Burs Projesi 'Moleküler Patoloji' alanında bursiyer statüsünde desteklenmeme olanak sağlayan Yüksek Öğretim Kurumu (YÖK)'na,

Doktora eğitim sürecimin bir bölümüne şahitlik eden ve yanımda olan sevgili eşim Abdullah Çil'e ve bana hayatta bambaşka bir sevgiyi tattıran minik kızım İnci Çil'e,

Hayatım boyunca her koşulda yanımda olan, bugünlere gelmemdeki en büyük destek kaynağı, sevgi, sabır ve dualarını hep üzerimde hissettiğim aile üyelerim, en değerlilerim; annem Canan Sarı'ya, babam Oğuz Sarı'ya, kardeşlerim Ayşenur, Cemre ve Tuna Sarı'ya sonsuz teşekkür ederim.

İlkokul yıllarımdan bu yana en büyük destekçim olan, her pes edişimde beni yeniden ayağa kaldıran ve daima bilimin yolunu aşılayan canım annem Canan Sarı'ya, en büyük teşekkürün bile yetersiz kalacağını bilerek, bu zorlu yedi yılın sonunda emeğimin karşılığı olan doktora tezimi ithaf etmek isterim.

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ .....
ŞEKİLLER DİZİNİ.....
SİMGELER VE KISALTMALAR.....
ÖZET..... v
ABSTRACT..... vii
1.GİRİŞ VE AMAÇ..... 1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi..... 1
1.2. Araştırmanın Amacı..... 2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri..... 2
2.GENEL BİLGİLER..... 3
2.1. Adipoz doku..... 3
2.2. Adipogenez..... 4
2.2.1. PPARγ ve C/EBPα'nın Adipogenezle İlişkili Moleküler Mekanizmaları. 6
2.2.2. SIRT1 ve SIRT2'nin Adipogenezle İlişkili Moleküler Mekanizmaları 8
2.2.3 In vitro adipogenez çalışmaları..... 9
2.3. Obezite..... 10
2.4. Boron..... 13
2.5. Hücresel NAD^+ düzeyi..... 19
2.6. SIRT1 enzim aktivitesi..... 20
3.GEREÇ VE YÖNTEM..... 22
3.1. Araştırmanın Tipi..... 22
3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı..... 22
3.3. Çalışma Materyali..... 22
3.4. Araştırmanın Değişkenleri..... 22
3.5. Veri Toplama Araçları..... 23
3.5.1. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar..... 23
3.5.2. 3T3-L1 Preadiposit Hücre Kültürü..... 25
3.5.3. 3T3-L1 Preadiposit Hücrelerin Olgun Adiposit Hücrelere Farklılaştırılması..... 27
3.5.4. Oil Red O Boyama..... 28
3.5.5. Borik Asit ve Kalsiyum Früktoborat Çözeltilerinin Hazırlanması..... 29
3.5.5.1. Deney Grupları..... 30
3.5.6. WST-1 Testi..... 32
3.5.7. Hücrelerden RNA izolasyonu..... 33

3.5.8. cDNA Sentezi 34
3.5.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu 35
3.5.10. Protein Ekstraksiyonu .....
3.5.11. Total Protein Tayini .....
3.5.12. Protein Düzeyinin ELISA ile Ölçülmesi .....
3.5.13. Hücresel NAD Ölçümü 39
3.5.14. SIRT1 Aktivite Ölçümü 41
3.6. Araştırma Planı 42
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi 42
3.8. Araştırmanın Kısıtlılıkları 42
3.9. Etik Kurul Onay 43
4.BULGULAR 44
4.1. 3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaştırılması 44
4.2. Boron Bileşiklerinin 3T3-L1 Adiposit Hücrelerde Sitotoksik Etkileri 46
4.3. Boron Bileşiklerinin Lipid Birikimi Üzerindeki Etkisi 47
4.4. Boron Uygulamasının Adiposit Hücrelerinde *SIRT1, SIRT2, C/EBPα* ve *PPARγ* Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi 50
4.5. Boron Uygulamasının Adiposit Hücrelerinde SIRT1, SIRT2, C/EBPα ve PPARγ Protein Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi 58
4.6. Boron Uygulamasının Hücresel NAD Düzeyine Etkisi 62
4.7. Boron Bileşiklerinin SIRT1 Aktivitesine Etkisi 64
5.TARTIŞMA 67
6.SONUÇ VE ÖNERİLER 76
7.KAYNAKLAR 77
8.EKLER 85
EK 1: ETİK KURUL ONAYI 85
EK 2: ÖZGEÇMİŞ 90

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: Obezitenin sınıflandırılması 11
Tablo 2: Obezite ile ilişkili temel sinyal yolları 13
Tablo 3: 2017 yılına ait dünya boron rezervlerinin dağılımı 13
Tablo 4: Yetişkin bireyler için boron alım düzeyleri 14
Tablo 5: Besinler ve içerdiği boron miktarı 15
Tablo 6: Başlıca boron bileşikleri, özellikleri ve kullanım alanları 17
Tablo 7: Projede kullanılan sarf malzemeler 23
Tablo 8: Projede kullanılan cihazlar 25
Tablo 9: Deney grupları 31
Tablo 10: PCR deney grupları 31
Tablo 11: cDNA sentez protokolü 35
Tablo 12: Tasarlanan Primer Sekansları 36
Tablo 13: Gerçek zamanlı PCR protokolü 36
Tablo 14: Kontrol ve CaFB uygulanan gruplara ait spektrofotometrik veriler 46
Tablo 15: Kontrol ve BA uygulanan gruplara ait spektrofotometrik veriler 47
Tablo 16: Adipositlerden ekstrakte edilen ORO boyasının absorbans değerleri (Kontrol ve CaFB Grupları) 49
Tablo 17: Adipositlerden ekstrakte edilen ORO boyasının absorbans değerleri (Kontrol ve BA Grupları) 49
Tablo 18: *PPARγ* geninin relatif mRNA değişimleri 51
Tablo 19: *C/EBPα* geninin relatif mRNA değişimleri 53
Tablo 20: *SIRT1* geninin relatif mRNA değişimleri 55
Tablo 21: *SIRT2* geninin relatif mRNA değişimleri 57
Tablo 22: NAD Standart eğri grafiğini oluşturan absorbans değerleri 63
Tablo 23: Floresans ölçüm değerleri 64
Tablo 24: CaFB grubunun SIRT1 inhibisyonu oranları 65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Adiposit türleri ve morfolojik farklılıklar 3
Şekil 2. Preadipositten olgun adiposite geçiş sürecinin farklı aşamaları. 5
Şekil 3. Adipogenez sırasında *PPARγ* ve *C/EBPα* ekspresyonunun moleküler düzenlenmesi. 7
Şekil 4. *SIRT1*'in metabolik sendromun belirtilerine karşı koruyucu etkisi ile ilgili temel metabolik etkileri. 8
Şekil 5. Adipogenez sürecinin şematik diyagramı 10
Şekil 6. Kalsiyum früktoborat (CaFB) kimyasal yapısı 16
Şekil 7. Borik asit (BA) kimyasal yapısı 18
Şekil 8. 3T3-L1 farklılaşmasının şematik gösterimi. 27
Şekil 9. 3T3-L1 hücre morfolojisi 44
Şekil 10. Adipositlerin farklılaşma aşamalarının ORO boyama ile gösterimi 45
Şekil 11. CaFB ile 48 saat inkübe edilen adipositlerin WST-1 bulguları. 46
Şekil 12. BA ile 48 saat inkübe edilen adipositlerin WST-1 bulguları. 47
Şekil 13. CaFB uygulanan ve uygulanmayan adipositlerde lipitlerin ORO boyama ile gösterimi. 48
Şekil 14. BA uygulanan ve uygulanmayan adipositlerde lipitlerin ORO boyama ile gösterimi. 48
Şekil 15. CaFB ve BA uygulanan adipositlerde lipit birikiminin ORO boyama ile kantitatif ölçümü. 50
Şekil 16. CaFB ve BA uygulanan hücrelerde *PPARγ* geni relatif mRNA bulguları. 52
Şekil 17. CaFB ve BA uygulanan hücrelerde *C/EBPα* geni relatif mRNA bulguları 54
Şekil 18. CaFB ve BA uygulanan hücrelerde *SIRT1* geni relatif mRNA bulguları. 56
Şekil 19. CaFB ve BA uygulanan hücrelerde *SIRT2* geni relatif mRNA bulguları. 58
Şekil 20. Albümin standart kalibrasyon eğrisi. 59
Şekil 21. PPARγ standart kalibrasyon eğrisi. 59
Şekil 22. SIRT1 standart kalibrasyon eğrisi. 60
Şekil 23. SIRT2 standart kalibrasyon eğrisi. 60
Şekil 24. C/EBPα standart kalibrasyon eğrisi. 61
Şekil 25. CaFB ve BA uygulanan hücrelerde PPARγ, SIRT1, SIRT2 ve C/EBPα protein ekspresyonu bulguları. 62
Şekil 26. NAD standart eğri grafiği. 63
Şekil 27. CaFB ve BA'nın 3T3-L1 adipositlerindeki NAD seviyelerine etkisi. 64
Şekil 28. CaFB ve BA'nın SIRT1 enzim aktivite düzeyine etkisi. 65

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPK: AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz

AP-1: Aktive Edici Protein-1

aP2: adipocyte Protein 2

ATCC: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu

BA: Borik Asit

BCS: Sığır Buzağı Serumu

BGM: Boron Glisin Monoester

C/EBP: CCAAT/Güçlendirici Bağlayıcı Proteinler

C/EBPα: CCAAT/Güçlendirici Bağlayıcı Protein α

C/EBPβ: CCAAT/ Güçlendirici Bağlayıcı Protein Beta

C/EBPδ: CCAAT/ Güçlendirici Bağlayıcı Protein Delta

CaFB: Kalsiyum Früktoborat

cDNA: Komplementer DNA

DEX: Dexamethasone

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EFSA: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi

ELISA: Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi

FABP4: Fatty Acid Binding Protein 4

FBS: Fetal Sığır Serumu

FDA: Gıda ve İlaç Dairesi

GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz

GLUT4: Glukoz Taşıyıcı Protein 4

hADSCs: İnsan Yağ Dokusu Kaynaklı Kök Hücreler

HPLC: Yüksek Performanslı Likit Kromatografi

IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine

IL-6: İnterlökin 6

INS: İnsülin

IRS-1: İnsülin Reseptör Substratı-1

KLF: Kruppel Benzeri Faktör

LPL: Lipoprotein Lipaz

mRNA: Haberci RNA

mTOR: Rapamisinin Memeli Hedefi

NaB: Sodyum Pentaborat Pentahidrat

NaBC1: Boron Spesifik Transporter

NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotidi

NCBI: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi

NF-κB: Nükleer Faktör kappa B

OECD: Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı

ORO: Oil Red O

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

PFA: Paraformaldehit

PPARγ: Peroksizom Proliferatörle Aktive Olan Reseptör γ

Pref-1: Preadiposit Faktör-1

RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RXR: Retinoid X Reseptörü

SIRT1: Sirtuin 1

SIRT2: Sirtuin 2

SPSS: Sosyal Bilimler İstatistik Paketi

SREBP-1: Sterol Yanıt Elementi Bağlayıcı Protein-1

STAT: Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörleri

T2DM: Tip 2 Diabetes Mellitus

TGF-β: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta

TNF-α: Tümör Nekroz Faktörü alfa

UCP1: Uncoupling Protein-1

VKİ: Vücut Kitle İndeksi

WST-1: Tetrazolyum Tuzu Substratı

BORUN SİRTUİNLER ÜZERİNDEKİ POTANSİYEL ETKİSİ İLE PROGENİTÖR HÜCRELERDE ADİPOGENEZİN MOLEKÜLER REGÜLASYONU

Doktora Tezi

Ezgi Nur ÇİL

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

ÖZET

Obezite, mortalite ve morbiditeye yol açabilen küresel bir halk sağlığı sorunudur. Etkili ve güvenli tedaviler için obezitenin patofizyolojisi üzerine yapılan çalışmalar adipogenez mekanizmalarına odaklanmaktadır. Birçok çalışma, doğal anti-obezite ajanlarının, obeziteyle ilişkili metabolik bozuklukları azaltmada peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör γ (*PPARγ*) ve CCAAT/güçlendirici bağlayıcı protein α (*C/EBPα*) genlerinin baskılanmasının etkili bir strateji olduğunu göstermiştir. Boron minerali ile kilo kaybı arasındaki ilişki daha önce bildirilmiş olsa da anti-adipojenik etkilerinin altında yatan mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir.

Çalışmamızda, yaygın kullanılan *in vitro* hücre modellerinden 3T3-L1 kullanılarak anti obezite potansiyeli olan boron türevlerinden mineral kaynaklı borik asit (BA) ve besin kaynaklı kalsiyum fruktoboratın (CaFB) adipogenez üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda; boron uygulanan 3T3-L1 hücrelerinin adipositlere farklılaştırılması, Oil Red O (ORO) boyama ile lipitlerin gösterilmesi ve kantitatif ölçümü, WST-1 testi ile sitotoksisitenin belirlenmesi, Sirtüin 1 *(SIRT1),* Sirtüin 2 *(SIRT2), PPARγ* ve *C/EBPα* genlerinin mRNA ve protein ekspresyonlarının ölçümü, hücresel NAD^+ ölçümü ve SIRT1 enzim aktivitesinin ölçümü yapılmıştır.

Çalışmamızda CaFB (2 mM ve 5 mM) ve BA'nın (100 ve 250 µg/mL) sitotoksik etki göstermeyen iki dozu belirlenmiştir. Boron uygulanan hücrelerde *PPARγ* ve *C/EBPα* genlerinin mRNA ve protein seviyeleri kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde baskılanmıştır. Uzun yaşam genleri olarak bilinen Sirtüinlerin ekspresyonu, boron uygulaması sonucu artmıştır. 5 mM CaFB uygulanan hücrelerde adipogenezin 6. ve 8. günlerinde *SIRT1* mRNA ölçümlerinde kontrole kıyasla 3 kat artış gözlenmiştir. Boron uygulaması ile hücresel NAD düzeyinde anlamlı değişiklik saptanmamıştır. Ayrıca çalışmamız CaFB'nin doza bağlı şekilde SIRT1 enzim aktivitesini inhibe ettiğini göstermektedir. Bu bulgu özellikle kanser alanında *SIRT1* inhibitörlerinin terapötik kullanımlarının araştırılmasında kullanılabilecek temel bilgiler sağlamaktadır.

Bulgularımız, CaFB uygulamasının BA'ya kıyasla adipogenez sürecini anlamlı düzeyde daha güçlü şekilde inhibe ettiğini ve lipid birikimini daha fazla azalttığını

ortaya koymaktadır. Bitkisel kaynaklı ve suda çözünebilen bir boron bileşiği olan CaFB, obeziteyle ilişkili nutrasötik formülasyonların geliştirilmesinde potansiyel bir ajan olarak umut vadetmektedir.

Anahtar Sözcükler: Adipogenez, Borik asit, Kalsiyum früktoborat, Obezite, 3T3-L1 hücre kültürü, Sirtüin

Tezin sayfa adedi: 107

Danışman: Doç. Dr. Yasemin Soysal

POTENTIAL EFFECT OF BORON ON SIRTUINS AND MOLECULAR REGULATION OF ADIPOGENESIS IN PROGENITOR CELLS

PhD Thesis

Ezgi Nur ÇİL

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Department of Molecular Medicine

ABSTRACT

Obesity is a global public health problem that can lead to mortality and morbidity. Studies on the pathophysiology of obesity focus on the mechanisms of adipogenesis for effective and safe treatments. Many studies have shown that suppression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (*PPARγ*) and CCAAT/enhancer binding protein α (*C/EBPα*) genes is an effective strategy for natural anti-obesity agents to reduce obesity-related metabolic disorders. Although the association between boron mineral and weight loss has been previously reported, the mechanisms underlying its anti-adipogenic effects are largely unknown.

In our study, we aimed to investigate the effects of two boron derivatives with anti-obesity potential - mineral-based boric acid (BA) and dietary calcium fructoborate (CaFB) - on adipogenesis using one of the widely used in vitro cell models, 3T3-L1. In this context, the experimental design included the differentiation of boron-treated 3T3-L1 cells into adipocytes, visualization and quantitative measurement of lipid accumulation by Oil Red O (ORO) staining, cytotoxicity assessment via WST-1 assay, evaluation of mRNA and protein expression levels of Sirtuin 1 (*SIRT1*), Sirtuin 2 *(SIRT2), PPARγ,* and *C/EBPα* genes, as well as measurement of intracellular NAD^+ levels and SIRT1 enzymatic activity.

In our study, two doses of CaFB (2 mM and 5 mM) and BA (100 and 250 µg/mL) without cytotoxic effects were determined. The mRNA and protein levels of *PPARγ* and *C/EBPα* genes were significantly suppressed in boron-treated cells compared to the control. The expression of Sirtuins, known as longevity genes, increased as a result of boron treatment. In cells treated with 5 mM CaFB, a 3-fold increase was observed in *SIRT1* mRNA measurements on days 6 and 8 of adipogenesis compared to the control. No significant change in cellular NAD level was detected with boron treatment. Our study also shows that CaFB inhibits SIRT1 enzyme activity in a dose-dependent manner. This finding provides basic information that can be used to investigate the therapeutic use of *SIRT1* inhibitors, especially in research of cancer.

Our findings reveal that CaFB treatment significantly inhibited the adipogenesis process more potently and reduced lipid accumulation more than BA. CaFB, a plant-derived and water-soluble boron compound, shows promise as a potential agent for the development of obesity-related nutraceutical formulations.

Keywords: Adipogenesis, Boric acid, Calcium fructoborate, Obesity, 3T3-L1 cell culture, Sirtuins
Page number: 107
Advisor: Doç. Dr. Yasemin Soysal

1.GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Obezite ve obezite ile ilişkili diyabet, metabolik sendrom, astım, kanser, hiperkolesterolemi ve kardiyovasküler hastalıklar önemli bir halk sağlığı sorunu ve küresel salgın haline gelmiştir (1). Obezite, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından sağlığı bozabilecek anormal veya aşırı yağ birikimi olarak tanımlanmıştır (2). Dünya obezite prevalansı giderek artmaktadır ve 2030 yılına kadar dünya nüfusunun beşte birinin obez olacağı belirtilmektedir (3). Yağ dokudaki yağ kütlesinin artışı hücre boyutu (hipertrofi) ile, hücre sayısı (hiperplazi) veya her ikisinin de artışı ile artabilmektedir. Hiperplazi doğrudan obeziteye neden olmasa da, çocukluk ve ergenlik dönemindeki adiposit sayıları, yetişkinlikte yağ dokusunun yağ kütlesini ve lipid depolama kapasitesini belirler (4). Preadipositler, adipojenik farklılaşma sürecinde çeşitli transkripsiyon faktörleri ve mekanizmalarının etkileşimi ile adipositlere dönüşür ve bu faktörler obezite ile ilgili terapötik yaklaşımlar için önemli hedeflerdir (5,6). Bu transkripsiyon faktörlerinden peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör γ (*PPARγ*) ve CCAAT/güçlendirici bağlayıcı protein α (*C/EBPα*), adipogenez sürecinin birincil aktivatörleridir. *PPARγ* ve *C/EBPα* birbirlerinin ekspresyonunu karşılıklı olarak indükleyerek adipogenez gen programının aktivasyonunda işbirliği yaparlar (7). İnsülin duyarlılaştırıcı ilaçlar için de reseptör olan *PPARγ*'nın ekspresyonunun düzenlenmesi beslenme, diyabet ve obezite açısından önemlidir (8).

Histon deasetilaz Sirtuin 1 *(SIRT1)* farklılaşma, enerji metabolizması ve stres direnci gibi birçok farklı süreçte önemli rollere sahiptir (9). Adipositlerin farklılaşmasında negatif bir rol gösteren *SIRT1,* son zamanlarda obezite ile mücadelede yeni bir terapötik hedef haline gelmiştir (10,11). Doğal ürünlerin *PPARγ* aktivitesini inhibe ettiği adipogenez karşıtı mekanizmalar yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Besinsel ve medikal maddeler olarak hareket edebilen doğal ürünlerin tanımlanması, adipogenezin düzenlenmesine ve dolayısıyla obezite tedavisine kritik bir katkı sağlayabilir (12).

Doğal bir mineral olarak boron, obezite karşıtı potansiyeli nedeniyle son yıllarda dikkat çekmektedir. Boron mineral metabolizması, hücre zarı fonksiyonu ve

stabilitesi, hormon reseptörleri ve transmembran sinyalizasyonu gibi birçok biyolojik süreçte önemli roller oynamaktadır (13). Kalsiyum früktoborat (CaFB) organik boron içeren bir şeker borat esteridir ve sebze olarak kereviz ve brokoli, meyve olarak üzüm ve erik gibi bitki bazlı gıdalarda bulunur. Şeker borat esterleri hücresel alım için en iyi boron formudur (14).

Literatürde CaFB ile ilgili çalışmalar sınırlı olup yaptığımız taramada şu ana kadar CaFB bileşiğinin adipogeneze etkisi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmadığı görülmüştür. Sentez bir madde olarak CaFB ve ticari formdaki borik asitin (BA) anti adipojenik potansiyelleri ile Sirtüin genlerine etkilerinin araştırıldığı tez çalışmamız literatürde ilktir (15). Borun NAD (Nikotinamid Adenin Dinükleotidi) ile olan etkileşimine dayanarak NAD bağımlı *SIRT1* ve boron ilişkisi ilk kez araştırılmıştır. Bu tez çalışması ile ortaya konulan bulgular, doğal boron bileşiklerinin obezite ile mücadelede yan etkisi olmayan daha güvenilir ve daha özgün etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesine olanak sağlayacak temeller içermektedir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Çalışmamızda, in vitro model kullanılarak anti obezite potansiyeli olan mineral ve besin kaynaklı boron türevlerinin preadipositlerde Sirtüin genleri üzerinden adipogenezdeki etkilerinin araştırılması, adipogenezin moleküler regülasyonunda boron ve Sirtüin etkileşiminin incelenmesi, hücresel NAD düzeylerinin ölçülmesi, *PPARγ* ve *C/EBPα* adipojenik transkripsiyon faktörlerinin protein ve gen ekspresyon düzeylerinin araştırılması ve kullanılan boron mineralleri içinden yağ birikimini önleme potansiyeli olan türevlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

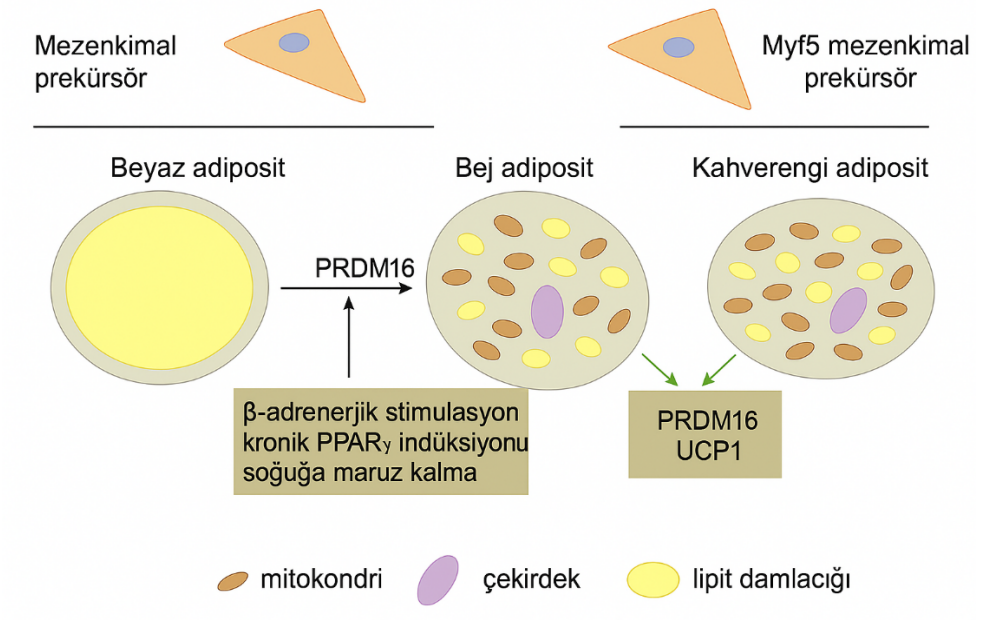
1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Kalsiyum früktoborat bileşiği şeker borat ester yapısıyla hücresel alım için en iyi boron formudur, bu nedenle borik asite kıyasla daha etkin davranarak Sirtüin ekspresyon düzeylerine etki eder, hücresel NAD düzeyini artırır, adipogenezde ana regülatör olan *PPARγ* ve *C/EBPα*'nın ekspresyonlarını baskılar, adipojenik farklılaşmayı inhibe eder, lipid birikimini baskılayarak anti obezite etkilerini gösterir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Adipoz doku

Adipoz (yağ) doku beyaz adipoz doku ve kahverengi adipoz doku olmak üzere iki farklı şekilde sınıflandırılır. Beyaz adipoz doku yetişkin insanlarda bulunan yağın çoğunluğunu oluşturur ve enerji homeostazı, insülin sinyali ve endokrin etki için kritik bir bölgedir. Kahverengi adipoz doku bebeklerde ve birçok memeli türünde bulunduğu bilinen önemli bir yağ deposudur, ağırlıklı olarak mitokondride uncoupling protein-1 *(UCP1)*'in aracılık ettiği termojenezden sorumludur (16, 17). Beyaz ve kahverengi adipositler farklı öncü hücrelerden türetilir ve farklı morfolojik özelliklere sahiptir (Şekil 1). Beyaz adipositler mezenkimal öncü hücrelerden türetilir, kahverengi adipositler Myf5 eksprese eden öncü hücrelerden türetilir. Olgun kahverengi adipositler çok odacıklı lipit damlacıkları içerir ve mitokondri açısından zengindir. Transkripsiyonel regülatör *PRDM16*'nın kahverengi adipoz doku depolarında kahverengi adipositlerin gelişimini kontrol ettiği gösterilmiştir. *PRDM16* hem kahverengi hem de beyaz adipositler içinde bulunur ve beyaz adipositleri bej adipositler haline dönüştürmede önemli bir faktördür (17).



Şekil 1. Adiposit türleri ve morfolojik farklılıklar (17).

Adipoz doku endotel hücreleri, kan hücreleri, fibroblastlar, perisitler, preadipositler, makrofajlar ve diğer bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinden oluşur (18). Ancak, yağ dokusunda baskın hücre popülasyonu olgun adipositlerdir (19). Preadipositlerin ana görevi, gerektiğinde olgun adipositlere farklılaşmaktır. Preadipositler, vücuttaki en büyük progenitör havuzlarından biri olan yağ dokusundaki hücrelerin %15-50'sini oluşturur (20).

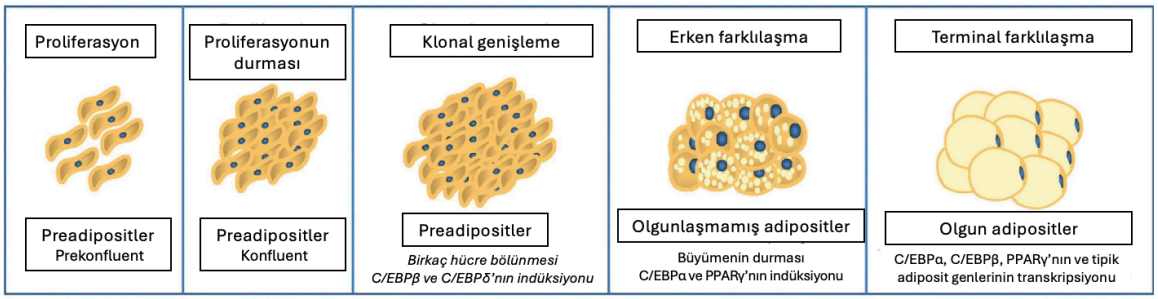
Yağ dokusu, sitotoksik yağ asitlerini daha az toksik trigliseritler olarak depolamak için besinin fazla bulunduğu zamanlarda genişleyebilme kapasitesine sahiptir (19). Besin varlığının devamlı olduğu zamanlarda yağ dokusunun genişlemesi yağ hücresi sayısındaki artışlarla sağlanır. Bu tür bir yağ dokusu genişlemesine izin vermek için preadiposit havuzu büyüktür (20). Bu süreçte, adiposit büyümesi belirli bir maksimum eşiğe ulaşıp yeni depolama birimlerinin farklılaşması gerektiğinde olgun adipositler ve preadipositler arasında iletişimi sağlayan yakın bir temas bulunur. Aşırı beslenme durumunda harcanan enerjinin de az olması sonucu enerji dengesi pozitif hale gelir, buna yanıt olarak adipoz dokunun etkili bir şekilde genişlemesi için beyaz adipositler sıkı bir denge içerisinde hipertrofiye (hacim artışı) ve ardından hiperplaziye (sayı artışı) uğrar. (21, 22). Büyüyen adipositler hipoksi, apoptoz ve inflamasyon oluşturur. Bu da makrofajların adipoz dokuya göçünü tetikler. İnflamasyonla birlikte TNF-α, IL-6 gibi proinflamatuar sitokinler salınır. Bu sitokinler, *IRS-1* (Insulin Receptor Substrate-1) fosforilasyonunu değiştirerek insülin sinyal yolunun bozulmasına yol açar. Bu durum, özellikle iskelet kası ve adipoz doku gibi insüline duyarlı dokularda glukoz alımının azalmasına neden olur. Hücre içine yeterince glukoz alınamadığında, kan dolaşımında glukoz birikir ve hiperglisemi gelişir. Süregelen hiperglisemi, pankreas β-hücreleri üzerinde baskı oluşturur, insülin salınımı artar ancak bir süre sonra bu mekanizma tükenir ve insülin direnci daha da şiddetlenir. Uzun vadede bu durum metabolik bozukluklara, özellikle tip 2 diyabetin gelişimine zemin hazırlar (23).

2.2. Adipogenez

Preadipositten adiposite farklılaşma sürecinin anlaşılması, obezite gibi sorunlara yanıt vermek için önemli bir ön koşuldur (24). Adipogenez, fibroblast benzeri preadipositlerin olgun adipositlere dönüştüğü, hücrelerin kendileri ve çevreleri

arasındaki iletişime dayalı oldukça karmaşık ve koordineli bir süreçtir, adiposit gelişiminde ve sistemik enerji homeostazında önemli bir rol oynar (25,26). Preadipositler, olgun adipositlere başarılı bir dönüşüm sağlamak için morfoloji ve gen ifadesinde belirgin değişikliklere uğrarlar (26). Kahverengi ve beyaz adipositler, preadipositlerin olgun yağ hücrelerine farklılaşmasını desteklemek için gerekli olan anahtar transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duyarlar (17). Adipogenezin moleküler ayrıntılarının çoğu hala bilinmese de, bu süreçte yer alan çok sayıda faktör tanımlanmıştır (26). Nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olan *PPARγ*'nın adipogenezin ana düzenleyicisi olarak hareket ettiği gösterilmiştir (27).

Preadipositten olgun adiposite geçiş sürecinin farklı aşamaları rapor edilmiştir (Şekil 2). İlk olarak hücreler konfluense ulaşır ve temas inhibisyonu gerçekleşir. Temas inhibisyonu ile proliferasyonun durduğu evrede preadiposit adiposite farklılaşmak için kararlı hale gelir. Bu evreyi mitotik bölünme ve hormon sinyalleri ile uyarılan klonal genişleme takip eder. Sonraki aşamada hücre bölünmesinin durduğu, karakteristik adiposit genlerinin kendilerini ifade etmeye başladığı ve lipid birikiminin başladığı erken bir farklılaşma evresi rapor edilmiştir. Tipik adiposit morfolojisine son olarak terminal farklılaşma aşaması ile ulaşılır ve olgun adipositlere özgü genlerin transkripsiyonu indüklenir (24). Bu aşamaların koordinasyonu, nükleer reseptör *PPARγ* ve CCAAT/güçlendirici bağlayıcı proteinler *(C/EBP)* transkripsiyon faktörleri ailesinin çeşitli üyelerinin önemli rol oynadığı karmaşık bir transkripsiyonel düzenleyici faktörler kaskadının kontrolü altındadır (6).



Şekil 2. Preadipositten olgun adiposite geçiş sürecinin farklı aşamaları (24).

Bir dizi transkripsiyon faktörünün ardışık aktivasyonu ve koordineli ilerleyişi ile tamamen farklılaşmış olgun adipositler gelişim gösterir. Beyaz yağ hücrelerinde bu

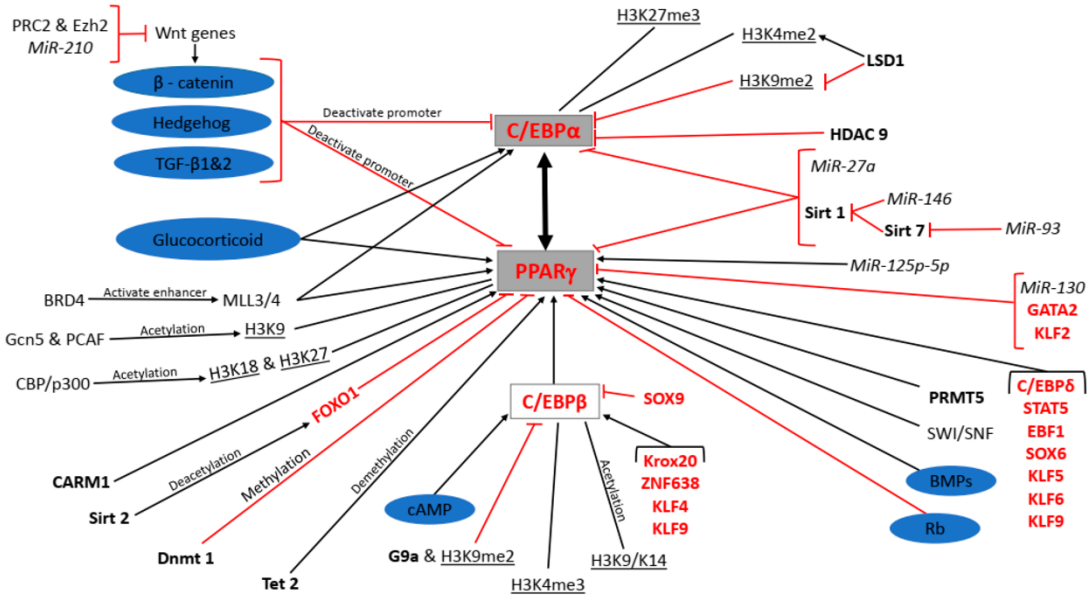
dizi, aktive edici protein-1 *(AP-1)* transkripsiyon faktörleri ailesinin üyelerinin aktivasyonuyla başlar ve kritik bir proadipojenik transkripsiyon faktörü olan *PPARγ*'nın indüksiyonu ve ekspresyonuyla devam eder. Bu transkripsiyonel düzenleyiciler arasında *C/EBP*'ler, sinyal dönüştürücüler ve transkripsiyon aktivatörleri *(STAT'lar),* Kruppel benzeri faktör *(KLF)* proteinleri, sterol yanıt elementi bağlayıcı protein-1 *(SREBP-1)* gibi transkripsiyon faktörleri yağ hücresi olgunlaşmasını kolaylaştırır. Preadiposit faktör-1 *(Pref-1), GATA* ve *Wnt* ailelerinin üyeleri dahil olmak üzere yağ hücresi farklılaşmasının güçlü negatif baskılayıcıları da bilinmektedir (17). Negatif baskılayıcı faktörlerin aşırı ekspresyonunun *PPARγ* fonksiyonunu bozduğu ve bunun, lipid metabolizması ile insülin sinyallemesiyle ilişkili anahtar genlerin ekspresyonunu aşağı regüle ederek, 3T3-L1 adipositlerinde hücre boyutunu ve lipid içeriğini azalttığı bildirilmiştir (28). Bu doğrultuda, olgun beyaz ve kahverengi adipositlerde *PPARγ*'nın seçici olarak ortadan kaldırılması adiposit ölümüne yol açarken, preadiposit farklılaşması üzerinde çok az etkiye sahiptir (29). Bu nedenle *PPARγ*, obezite ile ilişkili hastalıkların tedavisi için terapötik bir hedef olarak kabul edilmiştir. Bu amaçla, *PPARγ* ekspresyonu ve aktivitesinin düzenlenmesi üzerine yoğun çalışmalar yapılmıştır (30, 31).

2.2.1. PPARγ ve C/EBPα'nın Adipogenezle İlişkili Moleküler Mekanizmaları

PPARγ geni, insan genomunda 3. kromozomun p25.2 lokasyonunda yer alır. Bu gen, *PPAR* ailesinin bir üyesidir ve özellikle adipogenez, glukoz homeostazı ve lipid metabolizması gibi metabolik süreçlerde önemli rol oynar. *PPARγ*'nın aktivasyonu, insülin duyarlılığı ve anti-inflamatuar etkilerle ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle *PPARγ*, obezite, tip 2 diyabet ve metabolik sendrom gibi hastalıkların tedavisinde önemli bir terapötik hedeftir (32). *PPARγ*'nın, özellikle *PPARγ2* izoformunun, adipogenezde ana regülatör olduğu kabul edilmektedir. *PPARγ*, retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturarak *PPAR* yanıt elemanlarına (PPRE) bağlanır ve adipogeneze özgü genlerin transkripsiyonunu başlatır. Bu genler; adipocyte protein 2 (*aP2/FABP4*), adiponektin, lipoprotein lipaz (*LPL*) ve glukoz taşıyıcı protein 4 (*GLUT4*) gibi yağ hücresi fonksiyonu ve metabolizmasında işlevleri ile bilinmektedir (6). *PPARγ*'nın aşırı ekspresyonu fibroblastlarda yağ hücresi farklılaşmasını başlatmak için yeterlidir,

PPARγ eksikliği ise adipojenik programları desteklemede başarısız olur ve lipodistrofiye neden olur (33–35).

C/EBP ailesinin bir üyesi olarak adipogenezin geç fazlarında devreye giren *C/EBPα* geni, insan genomunda 19. kromozom q13.11 bölgesinde bulunur (36). Adipogenez sırasında ilk *olarak C/EBPβ* ve *C/EBPδ* ekspresyonu artar; bu iki faktör daha sonra hem *PPARγ* hem de *C/EBPα* genlerinin transkripsiyonunu uyarır. *C/EBPα, PPARγ* ile birlikte pozitif geri besleme döngüsü oluşturarak karşılıklı ekspresyonlarını pekiştirir (Şekil 3). Bu sinerjik etkileşim, hücrelerin terminal farklılaşma aşamasına ulaşmasını sağlar ve bu sayede adipositlerde insülin duyarlılığı, lipid birikimi ve hormon sekresyonu gibi işlevsel özellikler gelişir (6). *C/EBPα* ile yapılan ektopik ifade çalışmaları, adipogenezise duyarlı öncü hücre hatlarında ve aynı zamanda öncü olmayan fibroblastlarda *C/EBPα*'nın adipogenezi indüklemek için yeterli olduğunu göstermiştir. *C/EBPα* eksikliği olan fareler, önemli ölçüde düşük lipid birikimi fenotipine sahiptir (17). *C/EBPα, PPARγ* ile birlikte adipogenez için gereklidir, ancak *PPARγ* süreçte baskın görünmektedir (37).



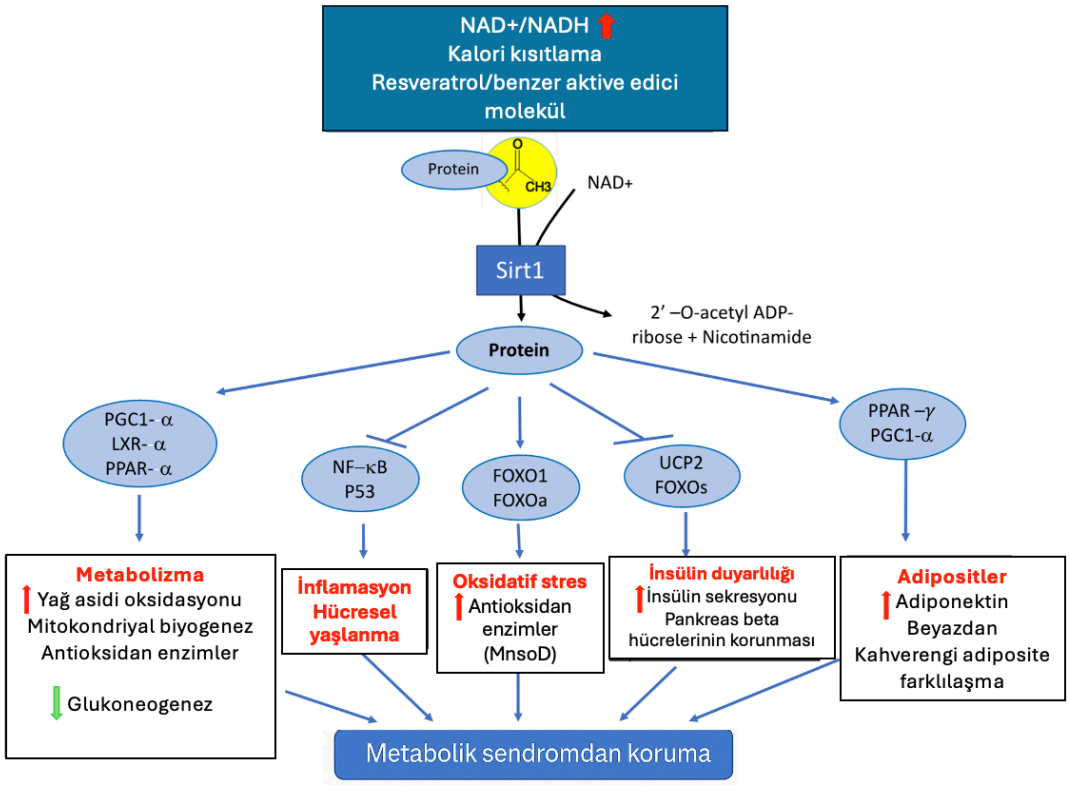
Şekil 3. Adipogenez sırasında *PPARγ* ve *C/EBPα* ekspresyonunun moleküler düzenlenmesi.

Sinyal yolları mor, miRNA'lar italik, enzimler kalın, transkripsiyon faktörleri kırmızı, epigenetik modifikasyonlar altı çizili, protein kompleksleri ve genler standart yazı

tipinde ve terminal farklılaşmanın ana düzenleyicileri gri gölgeli olarak gösterilmiştir (38).

2.2.2. SIRT1 ve SIRT2'nin Adipogenezle İlişkili Moleküler Mekanizmaları

SIRT1 geni, insan genomunda 10. kromozomun q21.3 bölgesinde yer alır (39). *SIRT1*, NAD^+ bağımlı bir deasetilaz olarak enerji metabolizmasını düzenler ve obeziteyle doğrudan ilişkilidir (40). *SIRT1*, glikoz ve lipid metabolizmasında merkezi bir rol oynar. Beyaz yağ dokusunda *PPARγ*'yı baskılayarak adipogenezisi azaltır ve yağ mobilizasyonunu destekler. *SIRT1*'in aktivitesi, kalori kısıtlaması gibi enerji kısıtlı durumlarda artar ve bu da obeziteye karşı koruyucu etki sağlar (41). Hipotalamusta iştahı ve enerji dengesini düzenleyen yolları etkileyerek iştahı kontrol eder. Ayrıca *SIRT1*, adipogenez sürecini baskılayarak yağ hücresi oluşumunu sınırlar ve inflamasyonu azaltarak insülin duyarlılığını artırır (Şekil 4) (42).



Şekil 4. *SIRT1*'in metabolik sendromun belirtilerine karşı koruyucu etkisi ile ilgili temel metabolik etkileri (43).

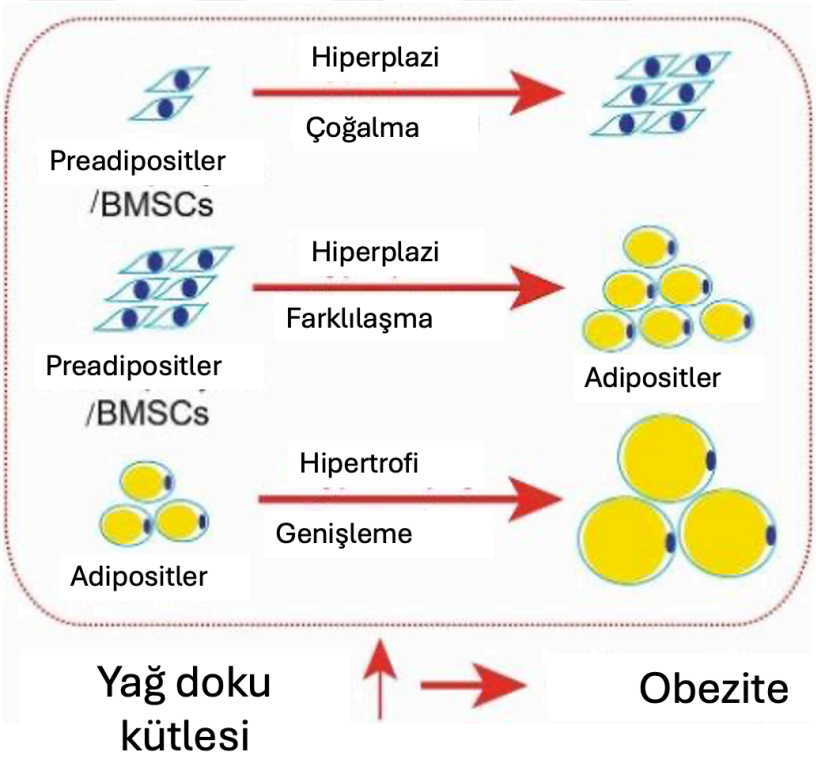
SIRT2 geni, insanlarda 19. kromozomun q13.32 bölgesinde yer almakta olup, hücre döngüsü, metabolizma ve stres yanıtı gibi birçok hayati süreçte rol oynayan bir NAD^+-bağımlı deasetilaz enzimini kodlar (44). Daha çok sitoplazmada yer alan *SIRT2*, başta yağ dokusu olmak üzere karaciğer, kas ve beyin gibi metabolik açıdan aktif dokularda yaygın olarak bulunur. *SIRT2* adipogenez sırasında *C/EBPβ* transkripsiyon faktörünü deasetile ederek yağ hücresi oluşumunu baskılar. Obez bireylerde, özellikle viseral yağ dokusunda *SIRT2* ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bu azalma, insülin direnci ve inflamasyonla ilişkilendirilmiştir. *SIRT2'*nin düşük ekspresyonu, obezite gelişimi, inflamasyon artışı ve glukoz metabolizması bozuklukları ile ilişkili görülmektedir. *SIRT2*'nin aşırı ekspresyonunda ise insülin duyarlılığının arttığı ve mitokondriyal fonksiyonun iyileştiği görülmüştür. Bu bağlamda, *SIRT2*'nin aktivitesini hedefleyen terapötik yaklaşımlar, obezite ve ilişkili metabolik bozuklukların tedavisinde önemli bir potansiyel taşımaktadır (45, 46).

2.2.3 In vitro adipogenez çalışmaları

Adipogenez ve adiposit fonksiyonlarının moleküler yolaklarını in vitro olarak incelemek amacıyla çeşitli hücresel model sistemleri kullanılmaktadır. Bu modeller genel olarak iki ana grupta sınıflandırılabilir. İlk grup, miyositler, kondrositler ve adipositler gibi farklı hücre tiplerine diferansiye olabilen pluripotent fibroblastları içermektedir. Bu grup, 10T1/2, BALB/c-3T3, RCJ3.1 ve CHEF/18 fibroblast hücre hatlarını kapsamaktadır. İkinci grup ise, adipositlere diferansiye olmaya kararlı fibroblast benzeri preadipositlerden oluşmaktadır ve 3T3-L1, 3T3-F442A, 1246, Ob1771, TA1 ve 30A5 preadiposit hücre hatlarını içermektedir. Bu ikinci grup, adipogenez sürecinin incelenmesinde en yaygın olarak tercih edilen hücresel model sistemlerini temsil etmektedir (17). 3T3-F442A ve 3T3-L1 en kapsamlı şekilde karakterize edilen ve kullanılan iki preadiposit hücre hattıdır. Bu hatların her ikisi de ayrıştırılmış 17 ila 19 günlük İsviçre 3T3 fare embriyolarından türetilmiştir (47, 48). 3T3-F442A ve 3T3-L1 hücre hatları, morfolojik (49) ve biyokimyasal (50) olarak *in situ* adipositlere benzer homojen bir olgun adiposit popülasyonu geliştirdikleri için tercih edilmektedir.

2.3. Obezite

Preadipositlerin adipogenezle olgun yağ hücrelerine dönüşümü ile başlayan obezite (vücutta aşırı yağ birikimi), hiperplazi ve hipertrofide yoğun bir artışla karakterize edilir ve dünya çapında mortalite ve morbidite ile sonuçlanan önemli bir sağlık sorunudur (51). Artmış vücut kitle indeksi (30 kg/m^2'den fazla) olarak tanımlanabilen obezite, kanser, hipertansiyon, osteoartrit ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere birçok kronik hastalığın patogenezi için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Ayrıca insülin direnci ve tip 2 diabetes mellitus (T2DM) dahil olmak üzere metabolik bozukluklarla yakından bağlantılıdır (52). Enerji alımı ve harcaması arasındaki dengenin bozulması obezitenin temelini oluşturur. Obezite, enerji harcamasını aşan sürekli enerji alımının bir sonucudur. Bu durum, doku adipositlerinin hem hiperplazisine (sayıca artış) hem de hipertrofisine (boyut olarak artış) yol açar (Şekil 5) (53).



Şekil 5. Adipogenez sürecinin şematik diyagramı (53).

Obezitenin patogenezinde genetik, epigenetik, hormonal ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimi rol oynar. Moleküler düzeyde, enerji dengesi bozuklukları, sinyal

yolaklarındaki değişiklikler ve inflamatuar süreçler obezitenin gelişiminde kritik öneme sahiptir (54). Obezite, genellikle vücut kitle indeksi (VKİ) temel alınarak sınıflandırılır. VKİ, kilogram cinsinden vücut ağırlığının, metre cinsinden boy uzunluğunun karesine bölünmesiyle elde edilir (kg/m²). DSÖ tarafından belirlenen sınıflandırma aşağıdaki gibidir (Tablo 1) (55):

Tablo 1: Obezitenin sınıflandırılması

VKİ (kg/m²)	Sınıflandırma
18.5 – 24.9	Normal ağırlık
25.0 – 29.9	Fazla kilolu
30.0 – 34.9	Obezite Sınıf I (hafif obezite)
35.0 – 39.9	Obezite Sınıf II (orta derecede obezite)
≥ 40.0	Obezite Sınıf III (morbid obezite)

Bu sınıflandırma, obezitenin derecesine göre sağlık risklerinin artışıyla doğrudan ilişkilidir. Örneğin, VKİ arttıkça tip 2 diyabet, hipertansiyon, dislipidemi, kardiyovasküler hastalık ve bazı kanser türlerinin görülme riski de artmaktadır (56). VKİ'nin sınırlı yönleri nedeniyle (kas kitlesini ayırt edememesi gibi), bazı durumlarda bel çevresi ölçümü de ek tanı aracı olarak kullanılmaktadır. Erkeklerde ≥102 cm, kadınlarda ≥88 cm olan bel çevresi, viseral yağlanma ve metabolik sendrom riski açısından anlamlı kabul edilmektedir (57).

Yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıklarındaki değişikliklerle son yıllarda dünya çapında pandemik hale gelen obezitenin altta yatan patolojik mekanizmaları ile ilgili adipoz dokunun disregülasyonunu içeren çalışmalara devam edilmesine rağmen henüz patofizyolojisi aydınlatılamamıştır. Anti-obezite ilaçların olumsuz etkileri, morbid obez bireylere uygulanan bariatrik cerrahi yönteminin pahalılığı ve ciddi komplikasyonlarla seyretmesi, kalori kısıtlaması gibi diyet müdahalelerinin uzun vadeli etkilerinin sınırlılığı ve klinik düzeyde güvenli ve etkili bir tedavinin olmaması, obezite ve ilgili komplikasyonların tedavisi için yeni, invazif olmayan yöntemlere ciddi bir ihtiyaç olduğunu göstermektedir (58).

Günümüzde obezite prevalansı küresel ölçekte hızla artmakta olup, 2022 yılı verilerine göre dünya genelinde 650 milyondan fazla yetişkin obezdir (2). Türkiye

%32 obezite oranıyla Avrupa ülkeleri arasında obezitede birinci, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Teşkilatı (OECD) ülkeleri arasında ise Amerika'dan sonra ikinci sırada gelmektedir. Etkilenen bireylerin yaşam sürelerini kısaltan, özellikle viseral yağ doku birikimi ile ilişkili olduğunda insülin direnci, tip 2 diyabet, dislipidemi, hipertansiyon gibi ciddi metabolik komplikasyonlarla seyreden obezitede bireylerin artan sağlık hizmeti yükü ve maliyeti ülkemiz için önemli bir sosyoekonomik sorundur. 2020 Küresel beslenme raporunda da belirtildiği gibi obezitenin hem maliyetli bir sağlık sorunu olması hem de metabolik komplikasyonlar açısından büyük bir risk faktörü olması sebebiyle, obeziteyi önlemenin sağlık sistemi üzerindeki yükü azaltacağı ön görülmektedir (59, 60). Adiposit farklılaşmasının engellenmesi adipogenez ve dolayısıyla obeziteye karşı potansiyel terapötik strateji olarak kullanılabilir. Bahsi geçen metabolik bozuklukların ve mortalitenin azaltılması ve yaşam kalitesinin artırılması için obezite ilişkili bazı adipokinlerin baskılanması ve/veya salgısının artırılması ile gelecek çalışmalara yön verilmesi gerekmektedir (61).

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA'lar gibi epigenetik mekanizmalar, gen ekspresyonunu çevresel etkilere (beslenme, stres gibi) bağlı olarak değiştirir ve obezite gelişimine katkıda bulunur (62). Bağırsak mikrobiyotası da enerji dengesinin düzenlenmesinde rol oynar. Obez bireylerde; *Firmicutes* türlerinin artışı, *Bacteroidetes* türlerinin azalması gözlenir. Bu değişim, diyet liflerinin fermantasyonu ile daha fazla enerji elde edilmesine ve yağ depolanmasının artmasına neden olabilir. (63). Artan yağ hücresi boyutu, bozulmuş yağ dokusu işlevi, artan lokal inflamasyon ve azalan lipid depolama kapasitesiyle ilişkilidir (64).

Obezitenin gelişiminde ve ilerlemesinde çeşitli hücresel sinyal yolları kritik rol oynar. Bu sinyal yolları, adipogenez, inflamasyon, insülin direnci ve enerji metabolizması gibi süreçleri düzenler (Tablo 2). Obezite gelişiminde, birbiriyle bağlantılı olan bu sinyal yollarının disfonksiyonu; enerji metabolizmasında dengesizlik, inflamasyonun artışı, insülin direnci ve lipotoksisite gibi sonuçlar doğurur (23). Bu moleküler bilgiler ışığında yeni nesil anti-obezite tedavileri, bu sinyal yollarını hedef alarak geliştirilmekte ve daha etkin müdahaleler sağlanması amaçlanmaktadır.

Tablo 2: Obezite ile ilişkili temel sinyal yolları

Sinyal Yolu	**Fonksiyon**	**Obezitedeki Rolü**
PPARγ (65)	Adipogenez ve lipid depolama	Yağ dokusu artışı
AMPK (66)	Enerji dengesi, lipoliz	Enerji harcamasında azalma
mTOR (67)	Hücre büyümesi	Adiposit hipertrofisi
JNK (68)	Stres ve inflamasyon yanıtı	İnsülin direnci
NF-κB (69)	İnflamasyon regülasyonu	Kronik inflamasyon
Leptin Yolu (70)	İştah kontrolü	Leptin direnci
TGF-β/Smad (71)	Fibrozis, doku remodelizasyonu	Adipoz doku fonksiyon bozukluğu

2.4. Boron

Yapılarında farklı oranlarda boron oksit (B_2O_3) içeren ve dünyada en fazla rezervi ülkemizde (Tablo 3) olan boron mineralleri doğada Ca, Mg, Na gibi metallerle oluşturduğu bileşikler halinde bulunurlar. Türkiye'deki başlıca boron yatakları, Kırka (Eskişehir), Bigadiç (Balıkesir), Kestelek (Bursa) ve Emet (Kütahya) bölgelerinde yoğunlaşmaktadır. Bu alanlar, ülkenin boron üretiminde stratejik öneme sahip sahalarıdır (72).

Tablo 3: 2017 yılına ait dünya boron rezervlerinin dağılımı (72)

Ülke	**Toplam Rezerv (Bin ton B_2O_3)**	**Toplam Rezerv (%)**
Türkiye	948.712	73,4 %
Rusya	100.000	7,7 %
A.B.D.	80.000	6,2 %
Şili	41.000	3,2 %
Çin	36.000	2,8 %

Mineral metabolizması, hücre zarı fonksiyonları ve stabilitesi, hormon reseptörleri ve transmembran sinyallemesi gibi çok sayıda mekanizmayı etkileyebilen boron insan beslenmesinde birçok biyolojik süreçte önemli rol oynayan temel bir mineraldir. Boron, bitkilerin, hayvanların ve insanların büyümesi için gerekli

bulunmuştur. Birçok organizma için esansiyel olduğu belirtilmiş olsa da boron elementi DSÖ'nün esansiyel element listesinde bulunmamaktadır. Yine de birçok biyolojik proseste önemli rol oynadığı bilinmekte ve giderek artan sayıda hücre kültürü, hayvan ve insan çalışmaları, besinsel miktarlardaki borun sağlığa yararlı etkileri olduğunu göstermektedir (73–75). DSÖ tarafından yetişkinler için günlük 1–13 mg aralığında güvenli boron alımı önerilmekte olup birçok toplumda ortalama alımın 1–2 mg/gün seviyesinde kaldığı görülmektedir. Bu tüketim miktarı bağışıklık sistemini desteklemek, oksidatif stresi azaltmak, hormon dengesini korumak ve kronik hastalıklardan korunmak için yetersiz kalmaktadır. Epidemiyolojik bulgular doğrultusunda, 3–6 mg/gün boron alımının**,** sürdürülebilir sağlıklı yaşamı desteklemede yeterli ve güvenli bir düzey olduğu kabul edilmektedir (Tablo 4) (76).

Tablo 4: Yetişkin bireyler için boron alım düzeyleri (77–80)

Parametre	Değer	Açıklama
DSÖ Günlük Alım Aralığı (Yetişkinler)	1 – 13 mg/gün	DSÖ tarafından güvenli kabul edilen günlük boron tüketim aralığıdır.
DSÖ Üst Tolere Edilebilir Alım Düzeyi (UL)	20 mg/gün	Yetişkin bireyler için belirlenen güvenli üst sınır düzeyidir.
Kandaki Ortalama Boron Konsantrasyonu	0.1 – 0.2 µg/g	Bireylerin kan örneklerinde tespit edilen boron seviyesidir.
DSÖ İçme Suyu İçin Güncel Boron Sınırı	2.4 mg/L	Önceki sınır 1.0 mg/L iken, borun sağlık üzerindeki olumlu etkilerine ilişkin veriler ışığında yükseltilmiştir.
NOEL (Advers Etki Gözlenmeyen Düzey)	9.6 mg/gün	Bilimsel çalışmalarda olumsuz etki saptanmayan en yüksek doz düzeyidir.
LOEL (En Düşük Gözlemlenebilir Advers Etki Düzeyi)	13.3 mg/gün	Advers etkilerin ilk kez gözlemlendiği en düşük doz düzeyidir.
ABD Diyetindeki Ortalama Boron Seviyesi	3 mg/kg (1.0 – 5.0 arası)	Günümüz Amerikan toplumunda gözlemlenen ortalama günlük boron tüketim düzeyidir.
Balıkesir (Osmanca/İskele) Günlük Alım Ortalaması (içme suyu)	6 – 8 mg/gün	Doğal boron maruziyeti bulunan bölgede tespit edilen günlük tüketim düzeyidir.
Sürdürülebilir Sağlık İçin Önerilen Günlük Alım (Epidemiyolojik bulgu)	3 – 6 mg/gün	Kronik hastalık risklerini azaltıcı etkilerle ilişkilendirilmiş ideal tüketim aralığıdır.

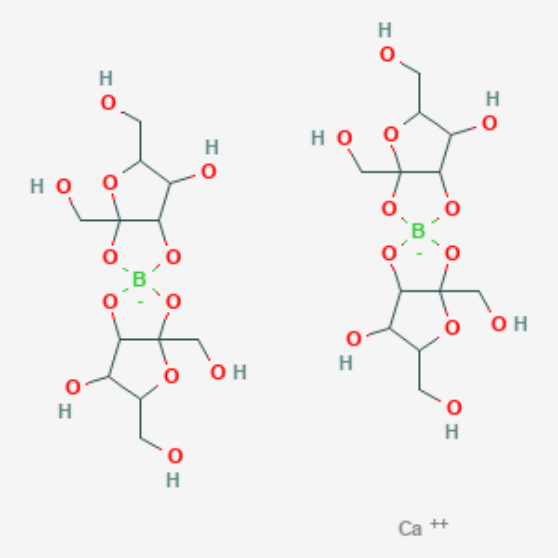
Boron açısından zengin bölgelerde (örneğin Balıkesir Osmanca ve İskele köyleri gibi) yapılan bir araştırma, yüksek günlük boron alımının (6–8 mg/gün) herhangi bir toksik etki oluşturmadığını, aksine kronik hastalıkların daha düşük oranda görüldüğünü göstermiştir. Ayrıca, Çin ve Türkiye'de yapılan insan çalışmaları, yüksek boron maruziyetinin erkek üreme sağlığı üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını ortaya koymuştur (80).

İnsanlar için borun ana kaynağı içme suyu olup diğer yiyeceklerde de bazı boron bileşikleri bulunur. Şeker boratları adı verilen doğal boron bileşenleri sık tüketilen sebzelerde, meyvelerde, tohumlarda ve sert kabuklu yemişlerde bulunur. Örneğin yer fıstığı en çok boron içeren besinlerden biridir (Tablo 5) (81).

Tablo 5: Besinler ve içerdiği boron miktarı (81)

Besin	**Boron İçeriği (µg/g)**
Yer fıstığı	5.83
Ceviz vb. kuru yemişler	2.64
Armut	2.27
Fasulye	2.05
Elma	1.87
Şeftali	1.75
Üzüm	1.40
Havuç	1.30
Ispanak	1.19
Portakal	1.07

CaFB, boron elementinin fruktoz ile oluşturduğu bir boron-şeker esteri olup, organik boron bileşikleri sınıfında yer alır (Şekil 6). Bitkisel besinler organik boron içeren moleküllerden CaFB'nin temel kaynağıdır. CaFB, sebze olarak kereviz ve brokoli ve meyve olarak üzüm ve erik gibi gıdalarda bulunur. Organik boron türleri arasında boron şeker esterleri, hücresel alım ve biyoyararlanım için en iyi boron formudur (14).



Şekil 6. Kalsiyum früktoborat (CaFB) kimyasal yapısı (14).

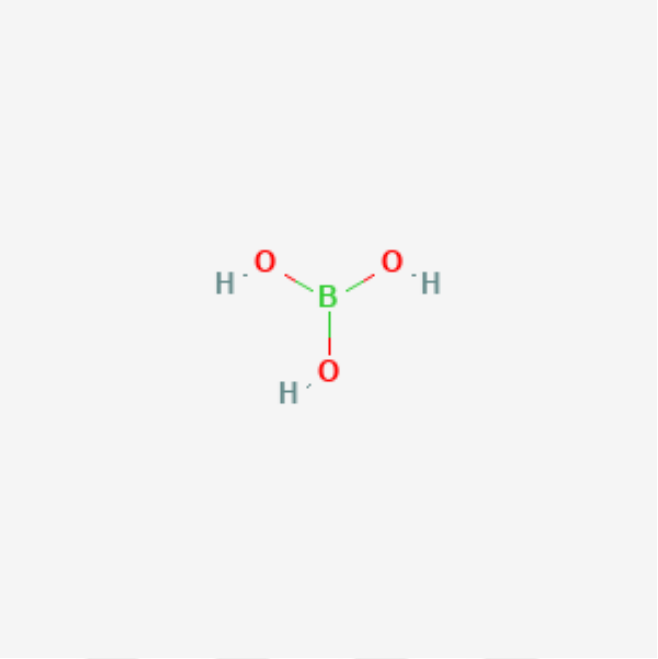
CaFB diyet takviyesi olarak sağlıklı bireylere verildiğinde sağlıklı inflamatuar yanıtı ve kan lipit düzeylerini desteklemiştir. Bu veriler CaFB'nin kardiyovasküler sağlığı desteklediğini göstermektedir (82). Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) paneli, CaFB'nin hamile ve emziren kadınlar hariç yetişkin popülasyon için 220 mg/gün'e kadar alım seviyelerinde güvenli olduğu sonucuna varmıştır (83). Endüstriyel olarak üretilmiş 216 gram CaFB ürününün tüketimi, yaklaşık olarak günde 5.6 mg boron alımına eşdeğerdir (84). Kalsiyum früktoborat ile karşılaştırıldığında, borik asit hücrelere boron spesifik transporter (NaBC1) kullanılarak taşınırken, CaFB muhtemelen bir şeker taşıyıcı kullanılarak taşınmaktadır. Bu sebeple kalsiyum früktoboratın bağırsak hücreleri, yağ hücreleri, kas hücreleri ve bazı kanserli hücreler gibi aşırı eksprese edilmiş şeker taşıyıcıları olan hücrelere karşı oldukça reaktif olduğu düşünülmektedir (14).

Boron elementinin doğada çeşitli kimyasal formları bulunur ve bu formlar fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkileri açısından farklılık gösterir (Tablo 6) (85). Bu türler arasında araştırmalarda yaygın olarak kullanılan ve biyolojik olarak daha aktif olan formlardan biri borik asit (H_3BO_3)'tir (Şekil 7). Sulu çözeltilerde genellikle $B(OH)_3$ formundadır. İnsan ve hayvan metabolizmasında en yaygın bulunan biyolojik olarak aktif formdur. Diyetle alınan borun büyük çoğunluğu borik asit veya borat formlarına dönüşerek dolaşıma katılır. Bu bağlamda, çeşitli inorganik boron formları

arasında borik asit hem biyoyararlanımı yüksek hem de metabolik işlevlerde doğrudan rol alan başlıca form olarak öne çıkmakta; bu yönüyle, insan sağlığı açısından fizyolojik olarak önemli kabul edilmektedir (85, 86).

Tablo 6: Başlıca bor bileşikleri, özellikleri ve kullanım alanları (75, 82, 84, 85)

Bileşik / Terim	**Kimyasal Form / Adı**	**Sınıfı**	**Biyolojik Aktivite**	**Kullanım Alanı**	**Açıklama**
Boron	B (element)	Element	Biyolojik etkisi yalnızca bileşik formlarıyla ortaya çıkar	Endüstri, cam, nükleer teknoloji, alaşımlar	Bilimsel literatürde "bor" yerine "boron" terimi kullanılır.
Borik Asit	H_3BO_3 / $B(OH)_3$	İnorganik asit	En yaygın ve biyolojik olarak aktif bor formudur	Diyet, antiseptik solüsyon, kozmetik, veteriner ürünler	İnsan metabolizmasında en yaygın ve aktif boron formudur.
Boratlar (genel)	BO_3^{3-}, $B(OH)_4^-$, $B_4O_7^{2-}$ vb.	İnorganik anyonlar	Dolaylı biyolojik aktivite (borik asite dönüşerek)	Cam-seramik üretimi, deterjanlar, tarımda gübre	Sindirim sisteminde borik aside dönüşerek aktif hâle gelirler.
Sodyum Pentaborat Pentahidrat	$NaB_5O_8 \cdot 5H_2O$	Borat tuzu (inorganik)	Doğrudan biyolojik etkisi sınırlı	Endüstriyel	Suda çözünür, çözündüğünde borat/borik asit formlarına dönüşebilir.
Boronik Asit	$RB(OH)_2$	Organobor bileşiği	Özgül biyolojik hedeflere bağlanabilir (enzim inhibisyonu vb.)	İlaç geliştirme (kanser, diyabet), moleküler tanı	Reaktif yapısı sayesinde biyomoleküllerle etkileşim kurar.
Kalsiyum Fruktoborat (CaFB)	$Ca[(C_6H_{10}O_6)_2BOH]_2$	Organik bor kompleksi	Anti-inflamatuar, kemik sağlığı, oksidatif stres azaltıcı etki	Besin takviyesi, osteoartrit destek tedavisi	Doğal kaynaklı, biyoyararlılığı yüksek bir bor bileşiğidir.



Şekil 7. Borik asit (BA) kimyasal yapısı (86).

Doğal bir bileşik olan boron, son yıllarda anti-obezite potansiyeli ile dikkat çekmektedir (13). Son çalışmalarda borun diyet takviyesi olarak kullanılması sonucunda kısa ve uzun vadeli kilo kaybı rapor edilmiştir (87). Bununla birlikte boron kaynaklı kilo kaybının altında yatan moleküler ve hücresel mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır. Günlük boron alımının bazı biyokimyasal ve hematolojik parametrelere ve sağlığa olan etkilerini araştıran retrospektif bir çalışmada, kadın ve erkeklerin diyetle bir günde alınan boron miktarı hesaplanmıştır. Haftalık beslenme günlükleri ve antropometrik kayıtları olan 50 hasta çalışmaya alınmış ve hesaplanan günlük boron alımı ile hastaların biyokimyasal, hematolojik ve antropometrik kayıtları arasındaki ilişki incelenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda beden kitle indeksi ile günlük boron alımı arasında anlamlı ve negatif korelasyon olduğu bildirilmiştir (78). 13 sağlıklı kadın ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada katılımcılar bir ay boyunca rutin diyetlerinden 10 mg daha fazla boron içeren diyetler tüketmiştir. Bu boron alımı, diyette kuru meyve, avokado ve kuruyemiş gibi boron bakımından zengin gıdaların artmasıyla sağlanmıştır. Bordan zengin diyet öncesi ve sonrası alınan kan, idrar ve tükürük örneklerinde bazı biyokimyasal ve hematolojik parametreler belirlenmiştir. Sonuç olarak serum total LDL, VLDL kolesterol ve trigliserit seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı; vücut ağırlığı, vücut yağ ağırlığı ve vücut kitle indeksinin de azaldığı

raporlanmıştır (87). Dört hafta süreyle diyetlerine 100 mg/kg boron takviyesi yapılan ratlarda vücut kütlesi, leptin ve insulin düzeyinin düştüğü gözlenmiştir (88). Farelerde yapılan benzer bir çalışmada, çok daha düşük dozda (0.2 mg/kg) oral borik asit alımı sonucu vücut kütlesinin azaldığı tespit edilmiştir (89).

Yüksek elekftrofilik yapısı nedeniyle, çeşitli ilaç adaylarına anahtar bileşenler olarak dahil edilen boron ve bileşikleri üzerine son on yılda önemli araştırmalar rapor edilmiştir. Bortezomib (Velcade), 2003 yılında Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilk boronik asit içeren ilaçtır. Boronik asitlerin genel olarak faydalı özellikleri nedeniyle, Velcade'in onayından bu yana, boronik asitlere olan ilgi tıbbi kimyada artmış ve ilaç otoriteleri tarafından onaylanan diğer iki ilacın keşfine yol açmıştır: iksazomib ve vaborbaktam 2015 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Yapılan çalışmalar boron bazlı biyoaktif bileşiklerin antimikrobiyal, antitümör, antiparaziter, antiprotozoal, antiinflamatuar, antidepresan, antialerjik, anestetik ve anti-alzheimer ajanlarının yanı sıra proteazom ve lipojenik inhibitörler olarak umut verici etkinlik ve daha az yan etki ile yeni boron türevli bileşiklerin keşfine yön vermektedir (90).

2.5. Hücresel NAD^+ düzeyi

Hücresel NAD^+ düzeyi**,** hücre içinde bulunan NAD^+ ve indirgenmiş formu NADH'nin miktarını ifade eder ve hücrenin metabolik ve redoks durumunun önemli bir göstergesidir. NAD^+, glikoliz, sitrik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon gibi enerji üretim süreçlerinde elektron taşıyıcısı olarak görev yapar ve ATP üretiminde merkezi bir rol oynar. Ayrıca NAD^+, Sirtuinler ve PARP enzimleri gibi NAD^+-bağımlı proteinlerin kofaktörü olarak işlev görür; bu enzimler DNA onarımı, gen ekspresyonu ve yaşlanma süreçlerinde kritik roller oynar. Hücrede NAD^+ düzeylerinin azalması, mitokondriyal disfonksiyon, artmış oksidatif stres ve hücresel yaşlanma gibi patofizyolojik durumlarla ilişkilidir. Bu nedenle NAD düzeyleri; yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar (örneğin Alzheimer, Parkinson), diyabet, kanser ve kardiyometabolik hastalıkların araştırılmasında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (91). Ayrıca NAD metabolizmasının düzenlenmesi, günümüzde terapötik hedef olarak araştırılmaktadır (92).

2.6. SIRT1 enzim aktivitesi

Sirtuinler, trikostatin A'ya duyarsız lisil-deasetilazların (sınıf III HDAC'ler) ayrı bir sınıfını temsil eder. Çekirdekte yer alan *SIRT1*'in, maya sessiz bilgi düzenleyicisi 2 *(Sir2)* ile en büyük homolojiye sahip olan insan Sirtuini olduğu ve p53 tümör baskılayıcının aktivitesini düzenlediği ve apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Resveratrol gibi SIRT1'in küçük molekül aktivatörleri, maya ve *C. elegans*'ın ömrünü kalori kısıtlamasına benzer bir şekilde uzattığı bildirilmekle birlikte SIRT1'in bu aktivasyonu tartışmalıdır. SIRT1 aktivasyonunun ardındaki mekanizmayı daha iyi aydınlatmak ve bunun yaşlanma, kanser ve nörodejeneratif hastalıklardaki rolünü belirlemek için ek araştırmalar yapılması gerekmektedir. p53'ün büyüme baskılayıcı fonksiyonu, DNA'ya zarar veren reaktifler tarafından güçlü bir şekilde güçlendirildiğinden, SIRT1 inhibitörlerinin etkili antikanser ilaçları olabileceği beklenmektedir (93, 94).

SIRT1, NAD^+ bağımlı sınıf III deasetilaz ailesine ait bir enzim olup hücresel yaşlanma, enerji metabolizması, inflamasyon ve stres yanıtı gibi birçok hayati süreçte rol oynamaktadır. SIRT1'in enzim aktivitesi, bu enzimin substratlarını (örneğin *p53, FOXO, PGC-1α* gibi) deasetile ederek fonksiyonel etkilerini gerçekleştirme kapasitesini ifade eder. SIRT1'in enzim aktivitesi, yalnızca ekspresyon düzeyinden değil, hücre içi NAD^+/NADH oranı gibi kofaktör mevcudiyetinden ve post-translasyonel modifikasyonlardan da doğrudan etkilenmektedir. Dolayısıyla, SIRT1'in biyolojik etkilerinin değerlendirilmesinde, protein miktarının veya gen ekspresyon düzeyinin saptanması tek başına yeterli olmamakta; fonksiyonel aktivitenin doğrudan ölçümü gerekmektedir. SIRT1 aktivitesi, genellikle fluorometrik veya kolorimetrik enzim aktivite kitleri kullanılarak değerlendirilir. Bu yöntemlerde, SIRT1'e özgü asetillenmiş bir peptit substrat, enzim tarafından deasetile edilir ve ardından substrat üzerinde gerçekleştirilen kimyasal bir reaksiyonla floresan ya da renkli ürün oluşumu sağlanır. Elde edilen sinyal, enzimatik aktiviteyle orantılı olarak ölçülür ve nicel analiz yapılmasına olanak tanır (95).

SIRT1 enzim aktivitesinin ölçülmesi, özellikle metabolik bozukluklar, yaşlanma, obezite ve kanser gibi patofizyolojik durumlarda bu enzimin işlevsel durumunu değerlendirmek açısından kritik öneme sahiptir. Enzim aktivitesi; gen

ekspresyonu (mRNA düzeyi) veya protein düzeyinden farklı olarak, enzimin hücre içi koşullar altındaki gerçek biyolojik işlevselliğini yansıtır. Bu nedenle, SIRT1'i hedef alan farmakolojik ajanların etkinliğinin değerlendirilmesinde ve NAD^+ metabolizmasına dayalı terapötik stratejilerin geliştirilmesinde, enzim aktivite analizleri temel bir biyokimyasal okuma yöntemi olarak öne çıkmaktadır (96–98).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu çalışma deneysel (*in vitro*) bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri, Zamanı ve Planı

Bu çalışma Ocak 2023 ile Şubat 2024 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) gerçekleştirilmiştir.

Proje başlangıç ve bitiş (BAP)	Eylül 2022- Mayıs 2025
Proje başlangıç ve bitiş (TÜBİTAK)	Kasım 2022- Ocak 2024
Malzeme alımının tamamlanması	Mart 2023
Ön deneyler, yöntem optimizasyonu	Ocak-Haziran 2023
Hücre kültürü	Mart 2023-Ocak 2024
WST-1	Nisan-Ağustos 2023
RT- PCR	Ağustos-Aralık 2023
Protein izolasyonu ve ELISA	Ekim-Aralık 2023
NAD ve SIRT1 aktivite ölçümü	Ocak-Şubat 2024
İstatistiksel analiz ve tez yazımı	Mart 2024-Mart 2025

3.3. Çalışma Materyali

Bu çalışmada 3T3-L1 fare fibroblast hücre hattı kullanıldı.

3.4. Araştırmanın Değişkenleri

Çalışmanın bağımsız değişkeni: Borik Asit ve Kalsiyum Früktoborat konsantrasyonları

Çalışmanın bağımlı değişkeni: *PPARγ, C/EBPα, SIRT1, SIRT2* mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri, SIRT1 enzim aktivite düzeyi, NAD düzeyi

3.5. Veri Toplama Araçları

3.5.1. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Tablo 7: Projede kullanılan sarf malzemeler

Malzeme Adı	**Markası/Kod**	**Kullanım Amacı**
3T3-L1 fare embriyonik fibroblast klon hücreleri	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC), CL-173	Çalışmalarda kullanılan hücre
Sığır buzağı serumu (BCS)	SERANA, S-CS-AU-015	Büyüme ortamına eklenen serum
%2 L-Glutamin	Gibco, 25030-024	Büyüme ortamına eklenen aminoasit
%1 Penisilin-Streptomisin	Sigma, P4344	Büyüme ortamına eklenen antibiyotik
Yüksek glikozlu (4,5 g/L) DMEM	Gibco, 41966-029	Hücrelerin büyümesi için bazal ortam
%0,25 Tripsin-EDTA	Gibco, 25200-056	Hücrelerin kaldırılması
DMSO (Dimetil sülfoksit)	Sigma, D2650	Hücre dondurma
Fetal Sığır Serumu (FBS)	Serox, SF101H-500	Büyüme ortamına eklenen serum
IBMX	Sigma, I5879	Farklılaştırma ajanı
DEX	Sigma, D4902	Farklılaştırma ajanı
İnsülin	Sigma, I0516	Farklılaştırma ajanı
Oil Red O	Sigma, O0625	Lipit boyama
Borik Asit	Merck, 10043-35-3	Etkisi araştırılan madde
0,22-0,45 µm filtre	Biosharp	Steril solüsyon elde etmek-Hücre kültürü
6-well plates	Corning	Hücre kültürü

25 cm² kültür flaskı	Jet Biofill	Hücre kültürü
75 cm² kültür flaskı	Jet Biofill	Hücre kültürü
96 kuyucuklu plak	Jet Biofill	Hücre kültürü
Steril serolojik pipet	Jet Biofill	Hücre kültürü
Hücre kazıyıcı	Jet Biofill	Hücre kültürü
Pipet uçları	Jet Biofill	Hücre kültürü
NucleoZOL	Macherey-Nagel, 740404.200	RNA izolasyonu
BlasTaq 2X qPCR MasterMix	abm, G891	Gerçek zamanlı PCR
Primerler	Oligomer	Gerçek zamanlı PCR
96 kuyucuklu PCR mikroplak	Roche	Gerçek zamanlı PCR
NAD/NADH Cell-Based Assay Kit	Cayman, 600480	Hücresel NAD ölçümü
WST-1 kiti	Cayman Chemical, 10008883	Hücre canlılığı analizi
SIRT1 Doğrudan Floresan Tarama Test Kiti	Cayman, 10010401	SIRT1 enzim ölçümü
RIPA lysis buffer	Thermo Scientific, 89900	Hücre lizisi
Protease inhibitor cocktail	Thermo Scientific, 78429	Protein ekstraksiyonu
PMSF	Sigma, P7626	Protein ekstraksiyonu
Bradford Protein Assay Kit	Thermo Scientific,23200	Protein konsantrasyon ölçümü
ELISA kit	ELK Biotechnology, ELK6397, ELK1633, ELK9507, ELK 9508	Protein analizi

Tablo 8: Projede kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	**Marka**	**Kullanım Amacı**
CO_2 inkübatörü	Heraus-HERACELL	Hücre kültürü idamesi
İnvert mikroskop	Nikon, Eclipse TS100	Hücrelerin mikroskobik incelenmesi
Derin dondurucu	Thermo ABD	RNA ve protein örneklerinin saklanması
Sıvı azot tankı	Thermo ABD	Dondurulan hücrelerin saklanması
Sınıf 2 biyogüvenlik Kabini	Heraeus HeraSafe	Hücre kültürünün steril ortamda yapılması
Mikroplak okuyucu	Biotek Synergy HT	Hücre canlılığı analizi, protein konsantrasyonu ölçümü
Soğuk santrifüj cihazda	Sigma, 2K15C	Protein ve RNA izolasyonu
Santrifüj	Hettich Rotofix	Hücre çöktürmesi
Spektrofotometre	2000/2000c NanoDrop, Thermo	DNA/RNA konsantrasyon ve saflık ölçümü
Thermal cycler	Bio-Rad	cDNA sentezi
Lightcycler 480	Roche	Gerçek zamanlı PCR
Distile su cihazı	Reservoir USF-Elga	Saf su eldesi
Vorteks	Wised (VM-10)	Çözelti karıştırma
Etüv	Memmert	Hücre kültürü malzemelerinin ısıtılması

3.5.2. 3T3-L1 Preadiposit Hücre Kültürü

Fare, sıçan veya insandan alınan yağ dokularının stromal vasküler fraksiyonundan elde edilen primer ya da klon hücre kültürleri adiposit farklılaşmasının araştırılması amacıyla kullanılır. Klon hücre kültürleri homojen hücre popülasyonu sağlaması ve sınırsız sayıda kültüre edilebilmesi gibi özellikleri ile primer kültürlerden

daha avantajlıdır. Yağ hücresi farklılaşmasında en yaygın kullanılan klon hücre tipi olan 3T3-L1 fibroblast hücrelerinin adiposite farklılaşması indüklendiğinde hücreler yapısal ve biyokimyasal olarak adiposit karakteristiklerini gösterirler. Preadipositler farklılaşmak için temas inhibisyonuna gereksinim duyarlar, bu sebeple farklılaşma çalışmalarında hücrelerin %100 konfluensiye ulaşmaları beklenir. Diferansiyasyonu indüklemek için 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone (DEX), ve insülin ajanları kullanılır (16).

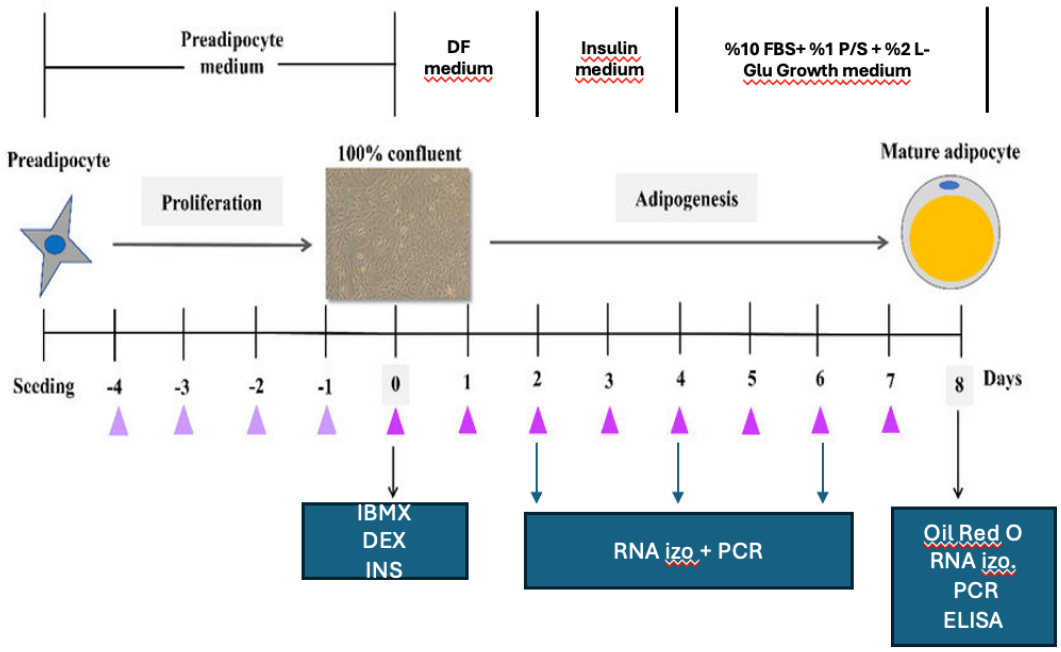
Çalışmamızda kullanılan fare emriyonik fibroblast klon hücre tipi olan beyaz yağ hücresi öncülü 3T3-L1 hücreleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC) satın alındı (CL-173; 70042667 ATCC, Manassas, VA, USA). Ticari hücre hattı soğuk zincirde teslim alındı. Önceden ısıtılmış su banyosunda 37°C'de kapak kısmından tutulup ısıtılarak hücre viali çözdürüldü. Hücrelerin kültüre edildiği yüksek glikozlu (4,5 g/L) DMEM (Gibco, 41966-029) ortamı hacim olarak %10 Sığır buzağı serumu (BCS) (SERANA, S-CS-AU-015), %2 L-Glutamin (Gibco, 25030-024) ve %1 Penisilin-Streptomisin (Sigma, P4344) içerecek şekilde hazırlandı. Çözülen hücrelere kültür ortamı eklenip 1600 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra oluşan tüpteki pellet tekrar büyüme ortamı ile çözdürülüp homojen bir şekilde karışması için nazikçe pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonunun önceden ısıtılmış 25 cm^2 'lik kültür kabına homojen dağılması amacıyla damla damla ekimi yapıldı. Hücre kültürü 37°C'de ve %5 CO_2'li nemlendirilmiş ortamda, inkübatörde (Heraus-HERACELL) idame ettirilmiştir.

Hücrelerin çoğalması günlük takip edilerek hücre konfluensi %70-80 olduğunda temas inhibisyonunu önlemek için pasajlandı. Eski hücre ortamı atılmış, kültür kabı 1xPBS (Fosfat Tamponlu Salin) ile hücre atıklarından ve fazla besi yerinden arındırmak için iki kez yıkandı ve %0,25 Tripsin-EDTA (Gibco, 25200-056) ilave edilerek 2-3 dakika inkübatörde bekletildi. Hücreler invert mikroskopta (Nikon, Eclipse TS100) ışık altında incelendi, kalkıp yüzdükleri görüldükten sonra 1:5 veya 1:7 oranında yeni kültür kaplarına pasajlandı. Hücreler yeterli sayıya ulaştığında her bir vialde 1 ml'de 1.000.000 hücre olacak şekilde dondurma işlemi yapıldı. Dondurma ortamı tamamlanmış DMEM besiyerinde %5 DMSO (Dimetil sülfoksit) (Sigma, D2650) olacak şekilde hazırlandı. Öncesinde oda sıcaklığına getirilen Mr. Frosty

dondurma kabına hazırlanan vialler etiketlenerek yerleştirildi. Mr. Frosty dondurma kabı -80 derecedeki derin dondurucuya (Thermo ABD) kaldırılarak hücrelerin 2 gün kademeli olarak donması sağlandı. Dondurulan hücrelerin bir kısmı sıvı azot tankına (Thermo) ve bir kısmı -80°C'lik derin dondurucuya kaldırılarak ilerleyen çalışmalarda kullanılacak olan hücre stokları oluşturuldu.

3.5.3. 3T3-L1 Preadiposit Hücrelerin Olgun Adiposit Hücrelere Farklılaştırılması

Farklılaşma için ayrılan hücrelerin sayımı yapılmış her kuyuda 150.000 hücre olacak şekilde 6 kuyulu hücre plakasına ekim yapıldı. 2 gün sonra, %100 yoğunluğa ulaşıp büyüdükleri alanı tamamen kaplayan hücrelerin besiyeri yenilenerek 2 gün daha inkübe edildi. Literatürde 0. gün olarak tanımlanan hücrelerin tam konfluent olduğu gün temas inhibisyonundaki hücrelere farklılaşma ortamı verildi (Şekil 8).



Şekil 8. 3T3-L1 farklılaşmasının şematik gösterimi. Kaynak (99)'dan uyarlanmıştır.

Farklılaşma besiyeri hacim olarak %10 Fetal Sığır Serumu (FBS) (Serox, SF101H-500), %2 L-Glutamin ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren yüksek glikozlu DMEM içerisine eklenen farklılaşma ajanları ile hazırlandı. Farklılaşmayı başlatmak için büyüme ortamına 0.5 mM IBMX (Sigma, I5879), 1µM DEX (Sigma, D4902) ve

1 µg/mL insülin (INS) (Sigma, I0516) ilave edilerek taze farklılaşma ortamı hazırlanıp filtrelendi ve hücrelere verildi. Farklılaşma besiyeri her deneyde taze olarak hazırlandı. 2 gün boyunca farklılaşma ortamında tutulan hücrelerin 2. gün ortamları atılarak 1 µg/mL INS içeren tamamlanmış besiyeri eklendi. 2 gün boyunca insülin içeren büyüme ortamında tutulan hücrelerin 4.gün besiyeri atıldı ve %10 FBS içeren tamamlanmış DMEM besiyeri ile ortam yenilendi. Her 48 saatte bir besiyeri yenilenen hücrelerin 6. günde besiyeri değiştirildi ve hücreler farklılaşmanın tamamlanmasına kadar (8. Gün) inkübe edildi. Tüm deneyler pasaj 6-8 arasındaki hücrelerle gerçekleştirildi.

3.5.4. Oil Red O Boyama

Nötral trigliseritleri ve lipidleri görüntülemek amacıyla yapılan oil red o (ORO) boyama yaygın kullanılan ve geçerli bir lipid boyama yöntemidir. Işık ve floresan mikroskobu ile görüntüleme yapılarak lipit birikimi değerlendirilebilir. Ayrıca, lipitlerden ekstrakte edilen boyanın spektrofotometrik ölçümü yapılarak lipid birikiminin kantitatif analizine de imkan sağlayan bir yöntemdir. Optimize ORO boyama protokolü, adiposit farklılaşmasını niceliksel olarak değerlendirmek için evrensel olarak kullanılmaktadır (100).

Çalışmamızda hücre içi lipid birikiminin değerlendirilmesi için boron uygulanan deney grupları ile boron uygulanmayan kontrol gruplarında farklılaşma düzeyleri 2-4-6-8. günlerde ORO boyama ile incelendi. Hücre farklılaşmasını morfolojik olarak belirlemek için Lillie ve Ashburn'un boyama yöntemi kullanıldı (101).

ORO boyanın hazırlanması: Ana stok çözeltisinin hazırlanmasında Kraus ve arkadaşlarının protokolü kullanıldı ve boya ışıktan korunarak oda sıcaklığında saklandı (102). Toz formunda satın alınan Oil Red O (Sigma, O0625) boyadan %0,5 konsantrasyonda ana stok çözelti hazırlamak için 0,2 gram tartılan boya 40 mL 2-propanol içinde çözdürüldü. Boya oda sıcaklığında alüminyum folyoya sarılı bir şekilde saklandı. Çalışma solüsyonu stok çözeltinin 3:2 oranında (3 birim boya ile 2 birim distile su karıştırılarak) distile su ile seyreltilmesiyle hazırlandı. Çalışma solüsyonu her bir deney için taze olarak hazırlandı ve kullanmadan önce 0,45 µm filtre ile bir kez filtrelendi (102).

Deney basamakları:

- Farklılaşma sonrasında 6 kuyucuklu kültür plakalarına ekilen hücrelerin besiyeri atılmış ve 1xPBS ile yıkandı.
- Hücrelerin fikse edilmesi için 1 mL %4'lük paraformaldehit (PFA) solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilerek hücreler sabitlendi.
- Süre sonunda PFA atılmış ve fikse edilen hücreler %60 izopropanol içeren solüsyonda 5 dakika inkübe edildi.
- İzopropanol atılıp uçurulduktan sonra boya çalışma solüsyonundan her bir kuyuya 2 mL eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- ORO çalışma solüsyonu atıldıktan sonra bağlanmamış boyayı çıkarmak için hücreler 4-5 kez distile su ile yıkandı. Lipit damlacıkları invert mikroskop altında kırmızı renkte görüntülendi.
- Spektrofotometrik ölçüm için bağlanan boya %100 izopropil alkol ile ekstrakte edildi ve ELISA okuyucu cihazda (Biotek Synergy HT) 490-510 nm optik absorbansta ölçülerek miktarı tayin edildi.

3.5.5. Borik Asit ve Kalsiyum Früktoborat Çözeltilerinin Hazırlanması

Borik asit (Merck, 10043-35-3) ticari formda satın alındı. Stok çözelti büyüme/farklılaşma ortamında 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlandıktan sonra 0,22 µm filtreden geçirildi. Konsantrasyonların belirlenmesi için literatürdeki çalışmalar örnek alınarak ön deneyler gerçekleştirildi (103–105). Ön deneylerde 1000 µg/mL üzerindeki konsantrasyonlar canlılığı ciddi derecede düşürdüğü için deneylerin devamında daha yüksek konsantrasyonlar çalışılmadı. 50 µg/mL'nin altındaki konsantrasyonların lipit oluşumunu baskılamada yetersiz olması sebebiyle deneylerin devamında daha düşük dozlar çalışılmadı. Ön deneylere göre 50 ile 1000 µg/mL arasındaki dozlar kullanılmak üzere; hücrelere verilmeden önce stok çözeltiden farklılaşma ortamında seyreltilerek 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda borik asit dilüsyonları hazırlandı.

Kalsiyum früktoborat Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Dr. Mehmet Ali Kısaçam'dan 2022

yılında temin edilmiştir. CaFB Kısaçam ve arkadaşları (106) tarafından Miljkovic'in (107) patentli yöntemine göre sentezlenmiş, karakterizasyonu termogravimetrik analiz ile yapılmış ve elde edilen veriler nihai ürünün aynı kimyasal yapıya ve %99,9 analitik saflığa sahip olduğunu, diferansiyel taramalı kalorimetre, nükleer manyetik rezonans ve indüktif olarak eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi ile gösterilmiştir. Kısaçam ve arkadaşları CaFB sentezinde Sigma Chemicals'dan satın alınan aseton, borik asit, CaCO3 ve fruktoz kullanmıştır (106).

CaFB stok çözeltisi 100 mM konsantrasyonda büyüme/farklılaşma ortamında hazırlandıktan sonra 0,22 μm filtreden geçirildi. Konsantrasyonların belirlenmesi amacıyla Kısaçam ve arkadaşlarının çalışması örnek alınarak ön deneyler gerçekleştirildi (108). CaCo-2 hücrelerinde CaFB'nin sitotoksik etkilerinin detaylı araştırıldığı bir çalışmada 10 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda CaFB sitotoksik etki göstermiştir (108). Bu bulgudan hareketle ön çalışmalarımızda en yükseği 20 mM olacak şekilde birçok konsantrasyon denendi ve 3T3-L1 hücreleri üzerinde CaFB'nin toksik etkisi görülmedi. Çalışılan skaladaki konsantrasyonlar arasında 2 mM ve 5 mM dozlar lipit oluşumunu baskılamada oldukça iyi bulunduğu için daha yüksek konsantrasyonların çalışılması ve sitotoksik etkilerinin incelenmesi gerekli görülmedi. Toksik olmayan, etkili minimum doz prensibine ve ön deneylere göre 1 ile 20 mM arasındaki dozlar kullanılmak üzere; hücrelere verilmeden önce stok çözeltiden farklılaşma ortamında seyreltilerek 1, 2, 5, 10 ve 20 mM konsantrasyonlarda CaFB dilüsyonları hazırlandı.

3.5.5.1. Deney Grupları

Çalışmada kullanılacak dozlar WST-1 testi ve ORO boyama deneylerinden elde edilen sonuçlara göre belirlendi. Hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermeden lipitler üzerinde baskılayıcı etki gösteren 2'şer doz seçildi. Deneysel uygulamalarda kullanılan dozlar hücre canlılığını etkilemeyecek şekilde, IC_{50} değerinin altında ve hücre ölümüne neden olmayan konsantrasyonlar olarak seçilmiştir. Kontrol grubu (madde eklenmemiş grup), borik asit ve kalsiyum früktoborat için 2'şer doz grupları olmak üzere 5 grup belirlendi (Tablo 9).

Tablo 9: Deney grupları

	Borik asit (BA)	**Kalsiyum früktoborat (CaFB)**
1.doz	100 µg/mL	2 mM
2.doz	250 µg/mL	5 mM

Diferansiyasyonun farklı zamanlarında gen ifade düzeyleri değişkenlik gösterebileceği için, literatürdeki çalışmalar da baz alınarak mRNA analizleri farklılaşmanın 2, 4, 6 ve 8. günlerinde total RNA izolasyonunu takiben yapılmıştır (103,109). Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT- PCR) çalışmaları için her iki maddenin ikişer dozu kullanıldı ve deney grupları diferansiyasyonun 2.,4.,6.,8. günlerinde RNA izolasyonu ile sonlandırılacak şekilde oluşturuldu (Tablo 10). Buna göre; 2.gün RNA izolasyonu yapılacak 5 grup, 4.gün için 5 grup, 6.gün için 5 grup ve 8.gün için 5 grup oluşturuldu.

Tablo 10: PCR deney grupları

Gün	**Gruplar**	**Genler**
2. Gün	Kontrol grubu (K) Borik asit düşük doz (B1) Borik asit yüksek doz (B2) Kalsiyum früktoborat düşük doz (C1) Kalsiyum früktoborat yüksek doz (C2)	*SIRT1* *SIRT2* *PPAR-γ* *C/EBP-α* *GAPDH*
4. Gün	Kontrol grubu (K) Borik asit düşük doz (B1) Borik asit yüksek doz (B2) Kalsiyum früktoborat düşük doz (C1) Kalsiyum früktoborat yüksek doz (C2)	*SIRT1* *SIRT2* *PPAR-γ* *C/EBP-α* *GAPDH*
6. Gün	Kontrol grubu (K) Borik asit düşük doz (B1) Borik asit yüksek doz (B2) Kalsiyum früktoborat düşük doz (C1) Kalsiyum früktoborat yüksek doz (C2)	*SIRT1* *SIRT2* *PPAR-γ* *C/EBP-α* *GAPDH*
8. Gün	Kontrol grubu (K) Borik asit düşük doz (B1) Borik asit yüksek doz (B2) Kalsiyum früktoborat düşük doz (C1) Kalsiyum früktoborat yüksek doz (C2)	*SIRT1* *SIRT2* *PPAR-γ* *C/EBP-α* *GAPDH*

3.5.6. WST-1 Testi

BA ve CaFB'nin adipogenez üzerindeki etkilerini araştırmadan önce toksik olmayan maksimum konsantrasyonları belirlemek için sitotoksisite analizi yapılmıştır. Sitotoksisitenin/hücre canlılığının belirlenmesi için kullanılan güncel yöntemlerden birisi canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenazları tarafından bir tetrazolyum tuzunun bir formazan ürününe çevrilmesi ve ortaya çıkan bu ürünün miktarının bir spektrofotometrede kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanan hızlı ve güvenilir bir metod olan WST-1 hücre proliferasyon analizidir (110). WST testlerinde hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenazların metabolik aktivitesi sonucu oluşan formazanlar suda çözünür olduğu için DMSO'da çözünme basamağını gerektirmez; bu da testin güvenirliliğini arttırır (110). Çalışmamızda ticari kit WST-1 (Cayman Chemical, 10008883) testi ile farklılaşma sürecindeki 3T3-L1 hücrelerde boron bileşiklerinin sitotoksik etkisinin olup olmadığı belirlenmiştir. Deneyler 5 teknik tekrar ve en az 3 biyolojik tekrar yapılarak tamamlanmıştır.

Deney basamakları:

- Hücreler 0,1 mL'de $6x10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilerek adiposit farklılaşma sürecine uygun olarak inkübe edildi.
- 48 saat sonra %100 yoğunluğa ulaşarak kuyuyu kaplayan hücrelerin ortamı yenilendi. 2 gün daha inkübe edilen hücrelerin diferansiyasyon için gerekli olan temas inhibisyonu sağlandı.
- Birleşme noktasına ulaştıktan iki gün sonra kontrol hücre grupları, 0.5 mM IBMX, 1.0 µM DEX ve 1 µg/mL insülin içeren farklılaşma ortamıyla muamele edilirken deney grubundaki hücreler birçok farklı konsantrasyonda BA (50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL) ve CaFB (10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM) içeren farklılaşma ortamına maruz bırakıldı.
- Hücreler 48 saat süren farklılaşma boyunca inkübe edildi.

- Farklılaşmanın gerçekleştiği 48 saat zaman aralığının sonunda her bir kuyuya WST-1 solüsyonundan 10 µL eklenen hücreler 2 saat daha 37°C'de inkübe edildi.
- Bunun yanında negatif kontrol grubu olarak farklılaşmayan post-konfluent durumdaki preadiposit hücrelerin de canlılık düzeyine bakıldı. Diğer kuyulara boş (blank) hücre kültür medyumu eklenerek kontrolü sağlandı.
- 2 saat sonunda 450 nm'deki absorbans ELISA plaka okuyucusu ile ölçüldü. Boron uygulanmadan farklılaşan kontrol hücre grubunun absorbansı %100 kabul edilip her bir deney grubu bu kontrole kıyaslanarak yüzde canlılık hesaplandı.
- Hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (111) :

Hesaplama: % Canlılık= (Ortalama Örnek Absorbans / Ortalama Kontrol Absorbans) x 100

3.5.7. Hücrelerden RNA izolasyonu

Adipogenez oldukça karmaşık ve koordineli gen ifade programına sahip, farklı zaman aralıklarında gen ifade düzeyleri değişkenlik gösterebilen, preadipositlerden olgun yağ hücrelerinin oluştuğu 8 günlük bir farklılaşma sürecidir. Adipositlerin farklılaşmasına yönelik farklı zamanlara ait 2, 4, 6 ve 8. günlerde gerçek RT-PCR analizlerinin RNA izolasyonunu takiben yapılması planlandı. RNA izolasyonu için NucleoZOL (Macherey-Nagel, 740404.200) reaktifi kullanıldı. NucleoZOL fenol ile guanidinyum tiyosiyanatın kombinasyonuna dayanan, sıvı faz ayrımı olmadan biyolojik numunelerden total RNA'nın hızlı bir şekilde izole edilmesini sağlayan uygun bir reaktiftir. Kloroform içermeyen bu yöntem ile yüksek saflıkta RNA elde edilmesi mümkündür.

Lizis: Total RNA izolasyonu yapılması için ayrılan hücrelerin besiyeri atılıp serum kalıntısını önlemek için PBS ile 2 defa yıkama yapıldı. Buz üzerine alındıktan sonra 6 kuyulu hücre plakalarında bulunan hücrelerin üzerine 500 µL ve 25 cm^2'lik flaskta bulunan hücrelerin üzerine ise 1 ml NucleoZOL reaktifi eklendi. NucleoZOL ilk aşamada yarım volümde eklendi, hücreler kazındı, pipetlendi ve homojenize

edilerek mikrosantrifüj tüplerine toplandı, ikinci aşamada kalan reaktif volümü de eklendi tekrar pipetleme yapılarak tüm hücrelerin parçalanarak toplanması sağlandı.

Kontaminantların çöktürülmesi: 500 µL NucleoZOL için 200 µL nükleaz içermeyen su lizata eklendi. 15 saniye kuvvetli vorteks yapılıp 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Önceden 4°C'ye soğutulan soğuk santrifüj cihazda (Sigma, 2K15C) 12,000x g hızda 15 dakika santrifüj edildi.

Total RNA'nın çöktürülmesi: Santrifüjden sonra 500 µL süpernatant dipteki pellete dokunulmadan dikkatlice alınarak yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 500 µL %100'lük izopropanol eklenmiş, tüp alt üst yapılmış ve oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 4°C'de 12,000x g hızda 10 dakika santrifüj edildi.

Total RNA yıkama: İkinci santrifüjden sonra mikrosantrifüj tüpte çökelen total RNA pelleti hareket ettirilmeden yavaşça süpernatant döküldü. Pellete 500 µL %75'lik etanol eklendi, pellet parmak hareketi ile kaldırılarak yüzdüğü görüldü. 3 dakika 4°C'de 8,000x g hızda santrifüj edildi. NucleoZOL atığı kalmaması için bu aşama 3 defa tekrarlandı.

RNA yeniden çözdürülmesi: Son aşamada 2-3 dakika tüpün ağzı açık bekletilerek etanolün uçması sağlandı ve hemen ardından 20 µL nükleaz içermeyen su eklendi, pellet hafif vorteks ile çözdürüldü.

RNA Örneklerinin Kantitasyonu: Elde edilen total RNA'ların konsantrasyonları ve saflığını belirlemek için Nanodrop (Thermo) cihazıyla spektrofotometrik ölçüm yapıldı. 1 µL su ile kör alınıp 1 µL örnek yükleyerek 2 ölçümün ortalaması alındı, 2 µL RNA konsantrasyon ölçümü için ayrıldı. RNA saflığını kontrol etmek adına A260/A280 ve A260/A230 oranlarında 1,8 ile 2,2 arasındaki örnekler kaliteli kabul edildi. Bu örneklerden komplementer DNA (cDNA) elde edilmek üzere gereken miktarda kullanıldı. Kalan kısım sonraki deneyler için -80˚C'ye kaldırıldı.

3.5.8. cDNA Sentezi

Total RNA'dan cDNA sentezi spesifik bir cDNA sentez kiti (abm, G236) yardımıyla üretici firmanın protokolü takip edilerek thermal cycler cihazında (Bio-

Rad) gerçekleştirildi. Örneklerdeki RNA konsantrasyonlarından 1 µg RNA'ya karşılık gelen hacim hesaplanarak önce 30 µL olan total hacim için tamamlanması gereken nükleaz içermeyen su miktarı RNAaz içermeyen steril PCR tüplerine konuldu, buz üzerinde çalışıldı. Daha sonra 6 µL 5X RT Buffer, 1.5 µL dNTP, 1.5 µL Primer, total RNA ve en son RTase enziminden 1.5 µL konularak karışım tamamlandı. Daha sonra kitin protokol aşamaları thermal cycler kullanılarak uygulandı. 55˚C'de 15 dk, 85˚C'de 5 dk olacak şekilde inkübe edildi ve sonraki deneyler için -20˚C'de saklandı Total hacim 20 µL olarak belirtilen kit protokolü 30 µL olacak şekilde modifiye edildi (Tablo 11).

Tablo 11: cDNA sentez protokolü

Bileşen	**Hacim (µL)**
5X RT Buffer	6.0 µL
dNTP	1.5 µL
Primer	1.5 µL
Total RNA	(1 µg RNA'ya karşılık gelen hacim)
RNase-Free Su	(30 µL'ye tamamlanacak şekilde)
RTase Enzim	1.5 µL

3.5.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RT-PCR analizi sentezlenen cDNA'lar kullanılarak SYBR Green ve EvaGreen içeren BlasTaq 2X qPCR MasterMix (abm, G891) ile üretici firmanın protokolü takip edilerek LightCycler 480 cihazında (Roche) gerçekleştirildi. RT-PCR yöntemi kullanılarak *PPARγ, C/EBPα, SIRT1* ve *SIRT2* genlerinin gen ifadesi çalışıldı. Örnekler arasında normalizasyon için housekeeping gen olarak *GAPDH* kullanıldı. Reaksiyonda analiz edilecek genlere özgü primerler literatür verilerine göre NCBI Blast veri tabanı kullanılarak belirlendi ve ticari olarak sentezlendi (Tablo 12).

Tablo 12: Tasarlanan Primer Sekansları

Gen	Primer Oligonükleotid Dizileri	
SIRT1	F	5'-AGAACCACCAAAGCGGAAA-3'
	R	3'-TCCCACAGGAAACAGAAACC-5'
SIRT2	F	5'-AGCCAACCATCTGCCACTAC-3'
	R	3'-CCAGCCCATCGTGTATTCT-5'
PPARγ	F	5'-TCAGCTCTGTGGACCTCTCC-3'
	R	3'-ACCCTTGCATCCTTCACAAG-5'
C/EBPα	F	5'-CAAGAACAGCAACGAGTACCG-3'
	R	3'-GTCACTGGTCAACTCCAGCAC-5'
GAPDH	F	5'-TCCCACTCTTCCACCTTC-3'
	R	3'-CTGTAGCCGTATTCATTGTC-5'

Amplifikasyonlar 40 µL reaksiyon karışımı hazırlanıp 96 kuyucuklu plak içerisine her kuyucukta toplam hacim 10 µL olacak şekilde 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Öncelikle primerlerin 100 µM'lık ana stoğu ve 1:10 dilüsyonlu ara stoğu nükleaz içermeyen su ile hazırlanarak ana ve ara stoklar -20˚C'de saklandı. Buz üzerinde hazırlanan steril PCR tüplerine 40 µL hacimde PCR karışımı hazırlamak için; 20 µL SYBR green içeren 2X master karışımı, 1 µL forward ve 1 µL reverse primer, 4 µL cDNA ve 14 µL nükleaz içermeyen su eklendi. Kısa bir vorteks yapıldıktan sonra kuyulara karışımdan 10'ar µL eklendi. Plak üzeri optik adhezif film ile kapatıldı. Plak cihaza konulmadan önce 1000 rpm'de 2 dk süreyle santrifüj edildi (Tablo 13).

Tablo 13: Gerçek zamanlı PCR protokolü

Bileşen	Hacim (µL)
2X Master Mix (SYBR Green içeren)	20 µL
Forward Primer	1 µL
Reverse Primer	1 µL
cDNA	4 µL
RNase-Free Su	14 µL
Toplam Hacim	40 µL

Gerçek zamanlı PCR reaksiyonu 95˚C'de 10 dk ön inkübasyon, 95˚C'de 15 sn., 57˚C'de 15 sn ve 60˚C'de 50 sn sürelerde 40 siklus olacak şekilde gerçekleştirildi. Erime eğrisi analiziyle ürünlerin kalite kontrolü gerçekleştirildi. Her bir reaksiyondan

elde edilen Ct değerleri ΔΔCt yöntemine göre analiz edildi (112). Excelde ΔCt değerleri, ekspresyon değişimini belirlemek amacıyla da ΔΔCt değerleri ve 2-ΔΔCt formülüyle de ekspresyon değişim miktarları hesaplandı. Gen ifadesi sonuçları ayrıca göreceli olarak GraphPad Prism 9 programı kullanılarak hesaplandı.

3.5.10. Protein Ekstraksiyonu

Hücrelerden protein ekstraksiyonu, proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Scientific,78429) ve PMSF (Sigma, P7626) ilave edilmiş RIPA tamponu (Thermo Scientific,89900) kullanılarak gerçekleştirildi. 100 µL RIPA lizis karışımı hazırlamak için 98 µL 1X RIPA, 1 µL PMSF ve 1 µL proteaz inhibitör kokteyli kullanıldı. Deneyler buz üzerinde çalışılarak tamamlandı, soğuk zincir kesintiye uğratılmadı.

Deney basamakları:

- 6 kuyulu hücre plakasının ortamı atılıp PBS eklenerek hücre kazıyıcı ile hücreler kazınıp 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere toplandı.
- Hücreler toplandıktan sonra 3000 rpm hızda 5 dk santrifüj edilmiş, hücre pelletine dokunmadan süpernatant atıldı ve pellet 100 µL RIPA lizis karışımı ile çözüldü.
- 30 dakika boyunca buzda bekletilen tüp ara ara vorteksle karıştırıldı.
- 15000 rpm hızda 15 dakika, +4˚C'de soğuk santrifüj işleminin ardından süpernatant faz yeni tüpe alındı, protein tayini için bir kısmı ayrıldı ve kalanı sonraki deneyler için -80˚C buzdolabına kaldırıldı.

3.5.11. Total Protein Tayini

Protein konsantrasyonu, her numunede eşit protein yüklemesini sağlamak için belirlendi. Bu yöntem Bradford Protein Assay Kit (Thermo Scientific,23200) yardımıyla 595 nm absorbansda toplam protein konsantrasyonu tespiti için kullanıldı. Albümin standart olarak kullanıldı. Protein örnekleri çözeltide bulunan commasie blue boyaya bağlanarak mavi-mor renk oluşturmaktadır ve renk yoğunluğu protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Konsantrasyonu bilinen albümin standartları kullanılarak oluşturulan standart eğri grafiğine göre örnekteki protein miktarı tayin edildi. Albümin konsantrasyonları 2000 µg/mL ana stoktan seri dilüsyonlarla 1500,

1000, 500, 250, 125 ve 50 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. 96 kuyulu plakaya örneklerden 5'er µL 3 tekrar olacak şekilde eklendi ve üzerine 200 µL commasie reaktifi eklenerek 15 dk çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Plaka okuyucu cihazda 595 nm absorbansda okuma yapıldı. Standart eğri grafiğine göre örneklerin protein konsantrasyonu hesaplandı.

3.5.12. Protein Düzeyinin ELISA ile Ölçülmesi

3T3-L1 adiposit hücre gruplarında PPARγ, C/EBPα, SIRT1, SIRT2 protein ekspresyonunun ölçümü için enzime bağlı immünoassay (ELISA) analizleri, üreticinin talimatlarına göre spesifik ELISA kitleri (ELK6397, ELK1633, ELK9507, ELK 9508, ELK Biotechnology, Wuhan, Çin) kullanılarak gerçekleştirildi. Fare PPARγ, C/EBPα, SIRT1 ve SIRT2'ye özgü antikorla kaplanmış 96 kuyulu plaklar kullanıldı. Proteinlerin antikora bağlanmasındaki artışla doğru orantılı olarak değişen renk şiddeti ölçüldü. 450 nm'deki absorbans bir mikroplaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. Her bir proteinin konsantrasyonu ilgili standart eğrilere göre hesaplandı ve ng/mL olarak ifade edildi. Ön çalışmalar sonucu hazırlanan örneklere PPARγ ve SIRT1 testleri için 1/200 seyreltme yapıldı, C/EBPα ve SIRT2 için 1/100 seyreltme yapıldı.

Deney uygulama basamakları;

- Yöntemde PPARγ, C/EBPα, SIRT1 ve SIRT2 standartları kullanıldı.
- PPARγ ve C/EBPα için standartlar 0-0.16-0.32-0.63-1.25-2.5-5-10 ng/mL; SIRT1 için 0-0.32-0.63-1.25-2.5-5-10-20 ng/mL ve SIRT2 için 0-1.57-3.13-6.25-12.5-25-50-100 ng/mL olacak şekilde hazırlandı.
- Her bir kuyuya 100 µL standart veya örnek eklendi. 37°C'de 80 dakika inkübe edildi.
- Süre sonunda plaka ters çevrilerek kuyulardaki sıvı döküldü. Her kuyuya 200 µL yıkama tamponu eklendi ve 3 defa yıkama yapıldı. Plaka temiz absorbant kağıda vurularak kurulandı.100 µL biyotinlenmiş antikor solüsyonundan eklenerek 37°C'de 50 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda plakadaki sıvı atıldı, yıkama ve kurutma işlemi bir önceki basamakta olduğu gibi tekrarlandı. Her kuyuya 100 µL 1× Streptavidin-HRP Çalışma Solüsyonu eklendi, 37°C'de 50 dakika inkübe edildi.

- Süre sonunda plakadaki sıvı atıldı, yıkama ve kurutma işlemi bir önceki basamakta olduğu gibi tekrarlandı. Her bir kuyuya 90 µL TMB Substrat Solüsyonu eklendi, karanlıkta 37°C'de 20 dakika inkübe edildi.
- Her kuyuya 50 µL durdurma solüsyonu eklendi, plaka 1 dakika boyunca bir plaka çalkalayıcıda çalkalandı. Sarı renge dönen kuyucuklar gözlendi ve 450 nm'de okuma yapıldı.

3.5.13. Hücresel NAD Ölçümü

Nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD) ve boron arasındaki etkileşimi araştırmak için satın alınan NAD/NADH Cell-Based Assay Kit (Cayman, 600480) yardımıyla üretici firmanın talimatları takip edilerek hücresel NAD ölçümü yapıldı. NAD, oksitlenmiş bir form olan NAD+'nın yanı sıra indirgenmiş bir form olan NADH'de bulunur. Hücrelerdeki ana serbest form olan NAD, hücresel redoks durumunu modüle etmede, sinyalleme ve transkripsiyonel olayları kontrol etmede işlev görür, bu da onu normal hücresel fonksiyonun araştırılmasında önemli bir kofaktör haline getirir. NAD/NADH Hücre Tabanlı Test Kiti, kültürlenmiş hücrelerde hücre içi NAD+ ve NADH'yi ölçmek için kolorimetrik bir yöntem sağlar. Bu deneyde, hücre örneklerinde bulunan NAD+, etanolün asetaldehite oksidasyonu sırasında alkol dehidrojenaz tarafından NADH'ye indirgenir. Örneklerde bulunan, yeni oluşan ve mevcut NADH daha sonra oksitlenir ve tetrazolyum tuzu substratının (WST-1) 450 nm'de emilen oldukça renkli bir formazana indirgenmesiyle sonuçlanır. Üretilen formazan miktarı, hücre lizatındaki toplam NAD miktarıyla orantılıdır ve toplam hücresel NAD konsantrasyonunun bir göstergesi olarak kullanılır (97, 112)

Hücresel NAD/NADH ölçümü için; 0,1 ml'de $6x10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilerek adiposit farklılaşma sürecine uygun olarak inkübe edildi. 48 saat sonra %100 yoğunluğa ulaşarak kuyuyu kaplayan hücrelerin ortamı yenilendi. 2 gün daha inkübe edilen hücrelerin diferansiyasyon için gerekli olan temas inhibisyonu sağlandı. Birleşme noktasına ulaştıktan iki gün sonra kontrol hücre grupları, 0.5 mM IBMX, 1.0 µM DEX ve 1 µg/mL insülin içeren farklılaşma ortamıyla muamele edilirken deney grubundaki hücrelere farklılaşma ortamı beraberinde CaFB

grubuna 2 mM ve 5 mM CaFB ile BA grubuna 100 µg/mL ve 250 µg/mL BA uygulandı, hücreler 48 saat inkübe edildi.

Test reaktiflerinin hazırlanması:

- HPLC-Grade su kullanılarak; assay tampon tablet 100 mL su ile çözdürüldü, liyofilize NAD+ standardı 1 mL su ile karıştırıldı, NAD+ diaphorase 150 µL suda çözdürüldü,
- 200 µL assay digitonin solüsyonu assay tampon ile 20 mL' ye tamamlanarak permeabilizasyon tamponu oluşturuldu.
- NAD+ standartları permeabilizasyon tampon ile 8 ayrı tüpte seri dilüsyon yapılarak hazırlandı.
- 10 mL reaksiyon solüsyonu için; 9,5 mL assay tampon üzerine 200 µL WST-1 developer reaktifi, 100 µL cell-based assay etanol solüsyonu, 100 µL alkol dehidrojenaz solüsyonu ve 100 µL NAD+ assay diaphorase solüsyonu karıştırıldı.

Deney basamakları:

- İnkübasyonu tamamlayan hücrelerin kültür ortamları atılıp 120 µL assay tamponu eklendi ve 500 x g hızda 5 dakika santrifüj yapıldı.
- Hücre tabakasına dokunmadan assay tampon çekildi.
- Her kuyuya 110 µL permeabilizasyon tampon eklendi, 30 dakika boyunca oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edildikten sonra 10 dakika 1,000 x g hızda santrifüj yapıldı.
- Yeni bir 96 kuyulu plakaya 100 µL NAD+ standardı ve hücre kültür kuyusundan 100 µL süpernatant yeni plakada ilgili kuyuya aktarıldı.
- Standartlar duplike, hücre örnekleri triplike olarak çalışıldı.
- Son olarak her kuyuya 100 µL reaksiyon solüsyonu eklendi, 90 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- Ölçüm için 450 nm'de mikroplaka okuyucuda absorbansları okundu.

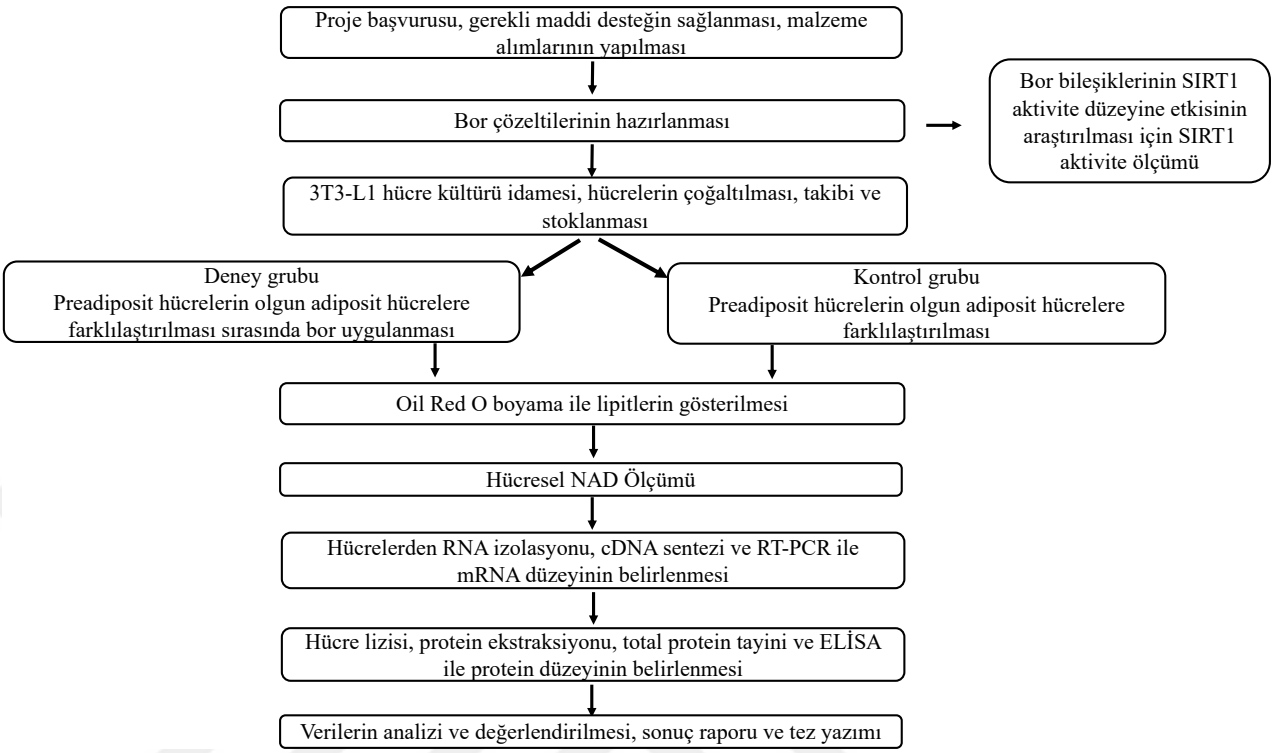
3.5.14. SIRT1 Aktivite Ölçümü

SIRT1 Doğrudan Floresan Tarama Test Kiti (Cayman, 10010401) SIRT1 inhibitörlerini veya aktivatörlerini taramak için bir floresans bazlı yöntem sağlar. Aynı mikroplakada 2 adımda gerçekleştirilir. p53 dizisini içeren substrat, kosubstrat NAD+ ile birlikte insan rekombinant SIRT1 ile inkübe edilir. Deasetilasyon gerçekleşir. İkinci aşamada developer ile muamele edilen substrat floresan ürün açığa çıkaracak şekilde hassaslaşır. Florofor, 350-360 nm eksitisyon ve 450-465 nm'lik bir emisyon dalga boyunda analiz edilir.

Deney basamakları:

- CaFB ve BA bileşikleri assay tamponu içerisinde çözdürülerek hazırlandı.
- 50 µL çalışma volümü içerisindeki son konsantrasyonları 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM CaFB ve 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL BA olacak şekilde eklendi.
- 96 kuyulu hücre plakasında %100 başlangıç aktivitesi kuyucuklarına 3 tekrarlı 30 µL assay tamponu ve 5 µL SIRT1 rekombinant eklendi.
- Backround kuyularına 3 tekrarlı 35 µL assay tamponu eklendi.
- İnhibitör/aktivatör kuyularına çalışılan her bir konsantrasyon madde için 3 tekrarlı olacak şekilde 25 µL assay tamponu, 5 µL SIRT1 rekombinant ve 5 µL inhibitör/aktivatör madde eklendi.
- Daha sonra tüm kuyulara 15 µL substrat solüsyonu eklenerek reaksiyon başlatıldı.
- Plaka kapatılarak oda sıcaklığında 45 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.
- Plaka kapağı çıkarılıp 50 µL stop solüsyonu eklendi ve tekrar 30 dk inkübe edildi.
- 360/460 nm'de floresans okuma yapıldı.
- Her bir örnek için % inhibisyon/aktivasyon hesaplamak için örnek değeri %100 başlangıç aktivitesi değerinden çıkarıldı ve sonuç %100 başlangıç aktivitesi değerine oranlanarak ifade edildi.

3.6. Araştırma Planı



3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

3T3-L1 hücre tabakası invert mikroskop altında ×10 ve ×20 büyütmede parlak bir alanda fotoğraflandı. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc.) ve SPSS 29 (sürüm 29.0; SPSS Inc., Chicago, IL) yazılımları kullanılarak İkiden fazla grup içeren analizlerde, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Veriler, üç bağımsız biyolojik deneyin ortalaması ± standart sapma (SD) şeklinde sunulmuştur. Karşılaştırmalar ANOVA ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ * ile, $p < 0.01$ ** ile, $p < 0.001$ *** ile ve $p < 0.0001$ **** ile gösterilmiştir.

3.8. Araştırmanın Kısıtlılıkları

Araştırmamız yalnızca 3T3-L1 hücre hattı kullanılarak yapılmıştır, elde edilen sonuçların *in vivo* deneylerle güçlendirilmesi gerekmektedir. Çalışmamız kapsamında 48. saatte yapılan hücresel NAD ölçümü için farklı zaman dilimleri de denenmelidir.

Kalsiyum früktoboratın adipojenik faktörleri hangi sinyal yolakları üzerinden baskıladığı ileri deneylerle detaylı araştırılmalıdır.

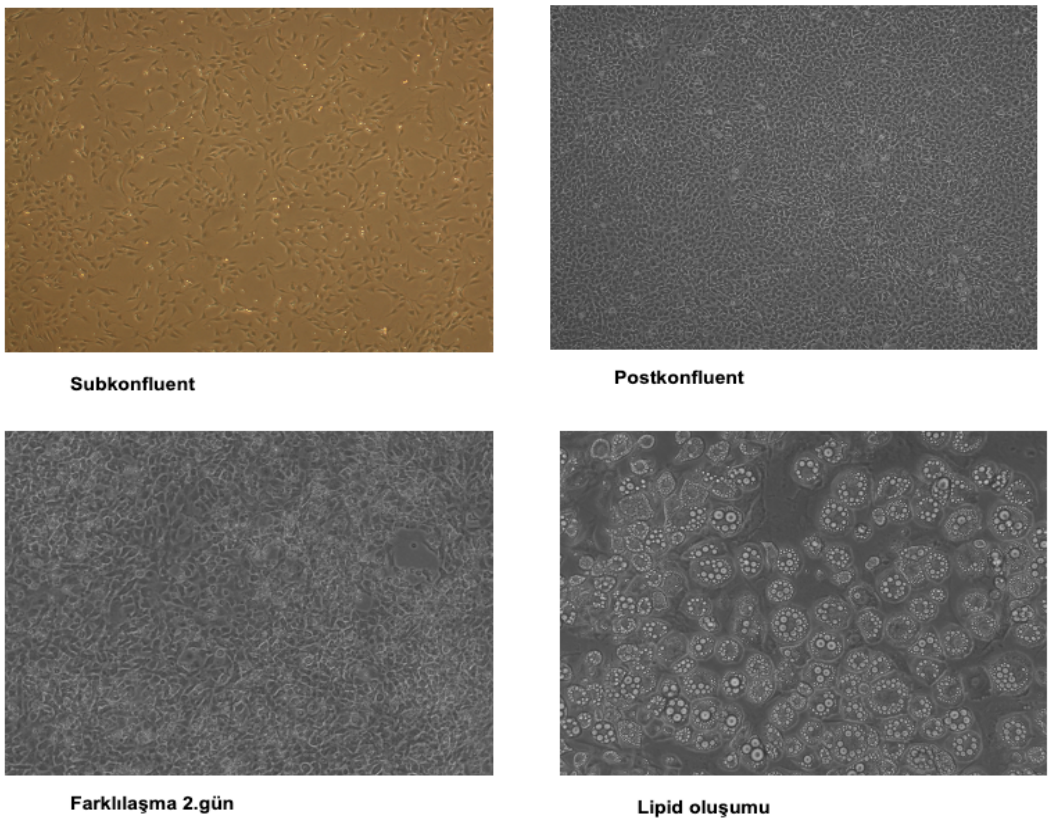
3.9. Etik Kurul Onay

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 18.01.2021 tarih ve 2021/02-71 no'lu kararı ile onaylanmıştır.

4.BULGULAR

4.1. 3T3-L1 Hücrelerinin Farklılaştırılması

3T3-L1 hücrelerinin sağlıklı bir şekilde adiposite farklılaşması en temel başarı ölçütü ve temel optimizasyon koşuludur. 3T3-L1 preadiposit hücrelerin adiposite farklılaşmalarını doğrulamak amacıyla ön çalışmalar yapılmıştır. İlk optimizasyon çalışmalarında adiposit farklılaşma süreci 14. güne kadar sürdürülerek lipit oluşumu izlenmiştir. Sıvı azot tankında dondurularak muhafaza edilen hücreler uygun koşullarda çözdürülmüş ve 25 cm^2 'lik hücre kültür kaplarına ekilmiştir. %100 hücre yoğunluğuna ulaşan hücreler 2 gün sonra IBMX, DEX ve insülin içeren farklılaşma ortamı ile indüklenmiştir. Hücrelerin dönüşüme başladığı ve morfolojilerinin oval bir yapıya döndüğü görülmektedir (Şekil 9).

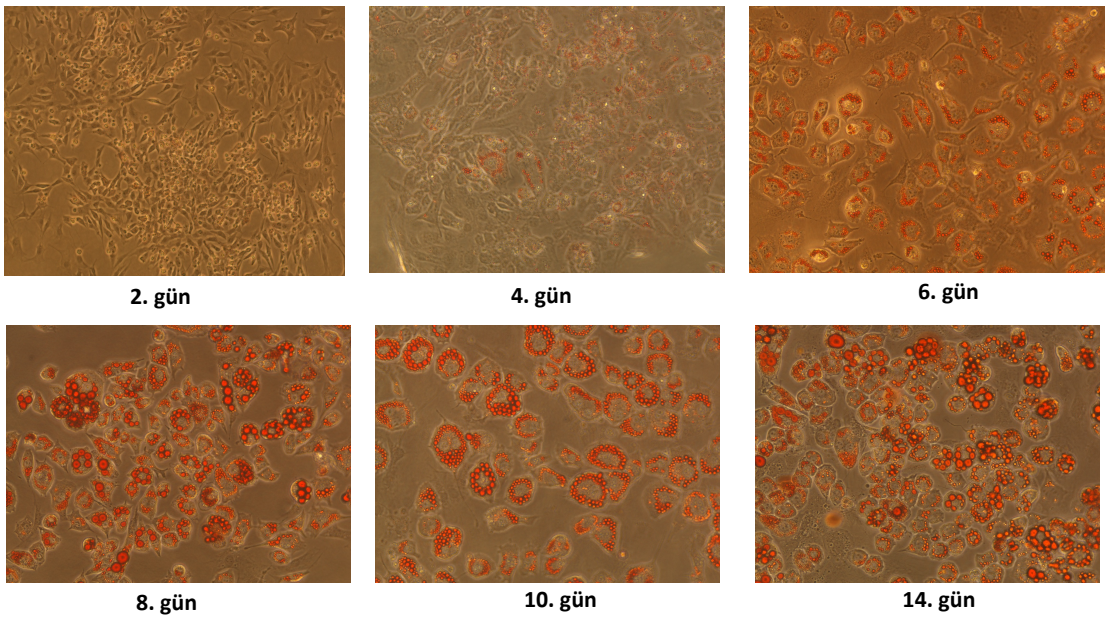


Şekil 9. 3T3-L1 hücre morfolojisi (10X inverted mikroskop görüntüsü).

Hücreler pasajlanırken yoğunluklarının %70'in üzerine çıkmamasına oldukça dikkat edilmesi gerekmektedir. Zamanla farklılaşma özelliklerini kaybetmemeleri için

bu en önemli koşullardan biridir. Farklılaşmak üzere ekilen hücreler %100 yoğunluğa ulaştıklarında iğsi yapıdaki fibroblastik görünümlerinden uzaklaşırlar. Farklılaşan hücreler ise daha yuvarlak bir morfoloji kazanırlar, adipogenezin ilerleyen günlerinde lipit dolu damlacıklar görünürken iğsi yapılar artık görülmez.

İkinci gün lipitler henüz belirginleşmediği için bu aşamada ORO boyama sonucunda lipit damlacıkları belirgin olarak boyanmamaktadır. İkinci gün hücrelere insülin içeren tamamlanmış büyüme ortamı verilmiştir. Dördüncü güne ulaşan hücrelerde ORO boyama ile lipitler belirgin görünmektedir. Dördüncü gün tamamlanmış FBS'li büyüme ortamı eklenen hücreler 6. gün ORO ile boyandığında daha büyük lipit damlacıkları görülmektedir. Bu şekilde her 2 günde bir besiyeri değişimi yapılarak 14 günlük adipogenez takip edilmiştir. Literatür ile uyumlu olarak hücreler 14. güne dek izlenmeye devam edilmiş ve yine literatürde belirtildiği gibi 8. gün adipogenezin tamamlanması için ideal bir süreç olarak görülmüştür (Şekil 10). Çalışmamızda yer alan deneyler için terminal farklılaşmanın tamamlandığı 8 günlük farklılaşma süreci uygulanmıştır



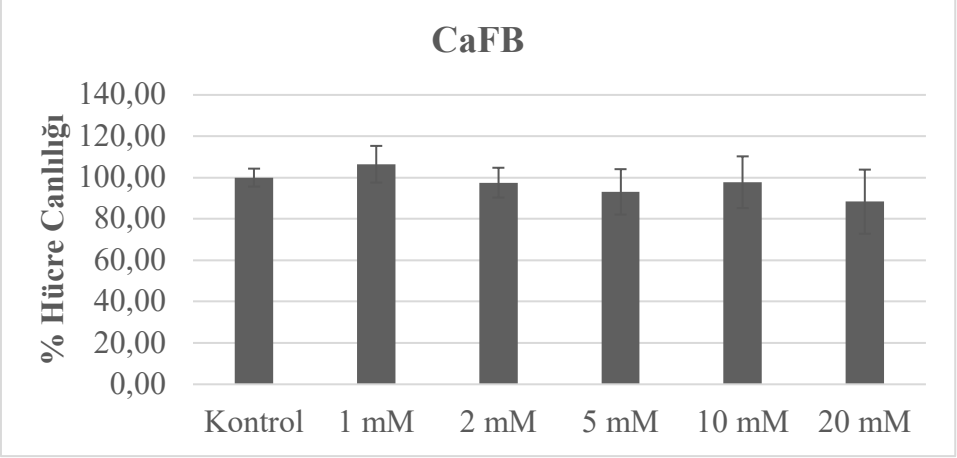
Şekil 10. Adipositlerin farklılaşma aşamalarının ORO boyama ile gösterimi (10X inverted mikroskop görüntüsü).

4.2. Boron Bileşiklerinin 3T3-L1 Adiposit Hücrelerde Sitotoksik Etkileri

CaFB ve BA bileşiklerinin adipogenez üzerindeki etkilerini araştırmadan önce, farklılaşan 3T3-L1 hücreleri üzerinde toksik olmayan konsantrasyonları belirlemek için sitotoksisite analizleri yapılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda, CaFB uygulaması adiposit hücreleri üzerinde anti-proliferatif etki göstermemiştir. Maksimum CaFB dozunda (20 mM) dahi canlılık %88 bulunmuştur (Tablo 14),(Şekil 11). BA uygulaması ise canlılığı doza bağlı bir şekilde azaltmıştır. WST-1 sonuçlarına göre, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda uygulanan BA bileşiğinin canlılık üzerindeki etkisi sırasıyla %98, %95, %82, %68, %65 olarak belirlenmiştir (Tablo 15),(Şekil 12).

Tablo 14: Kontrol ve CaFB uygulanan gruplara ait spektrofotometrik veriler

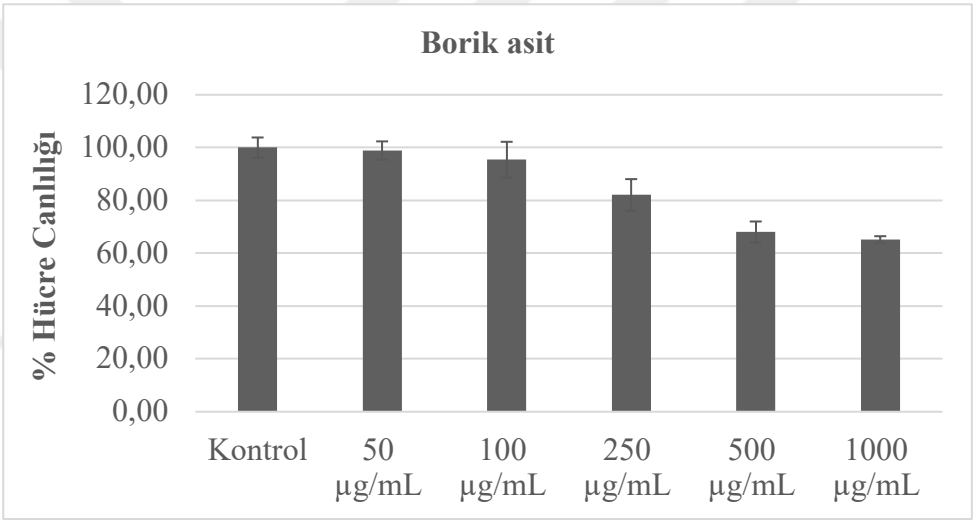
Deney Grupları	Ortalama Absorbans	Standart Sapma	% Hücre Canlılığı	%Standart Sapma	İstatistiksel Anlamlılık
Kontrol	1,597	0,06916285	100	4,33079845	-
1 mM	1,7	0,14191723	106,449593	8,886489	p > 0.05
2 mM	1,5578	0,11518116	97,5453976	7,21234575	p > 0.05
5 mM	1,48675	0,17533658	93,0964308	10,9791222	p > 0.05
10 mM	1,561	0,200015	97,7457733	12,5244208	p > 0.05
20 mM	1,411	0,24758635	88,3531622	15,5032153	p > 0.05



Şekil 11. CaFB ile 48 saat inkübe edilen adipositlerin WST-1 bulguları.

Tablo 15: Kontrol ve BA uygulanan gruplara ait spektrofotometrik veriler

Deney Grupları	Ortalama Absorbans	Standart Sapma	% Hücre Canlılığı	%Standart Sapma	İstatistiksel Anlamlılık
Kontrol	1,31375	0,05046038	100,00	3,84	-
50 µg/mL	1,2994	0,04541806	98,91	3,46	p > 0.05
100 µg/mL	1,2532	0,08957511	95,39	6,82	p > 0.05
250 µg/mL	1,0785	0,07857268	82,09	5,98	p > 0.05
500 µg/mL	0,8938	0,0525709	68,03	4,00	p <0,01
1000 µg/mL	0,8562	0,01694698	65,17	1,29	p <0,01



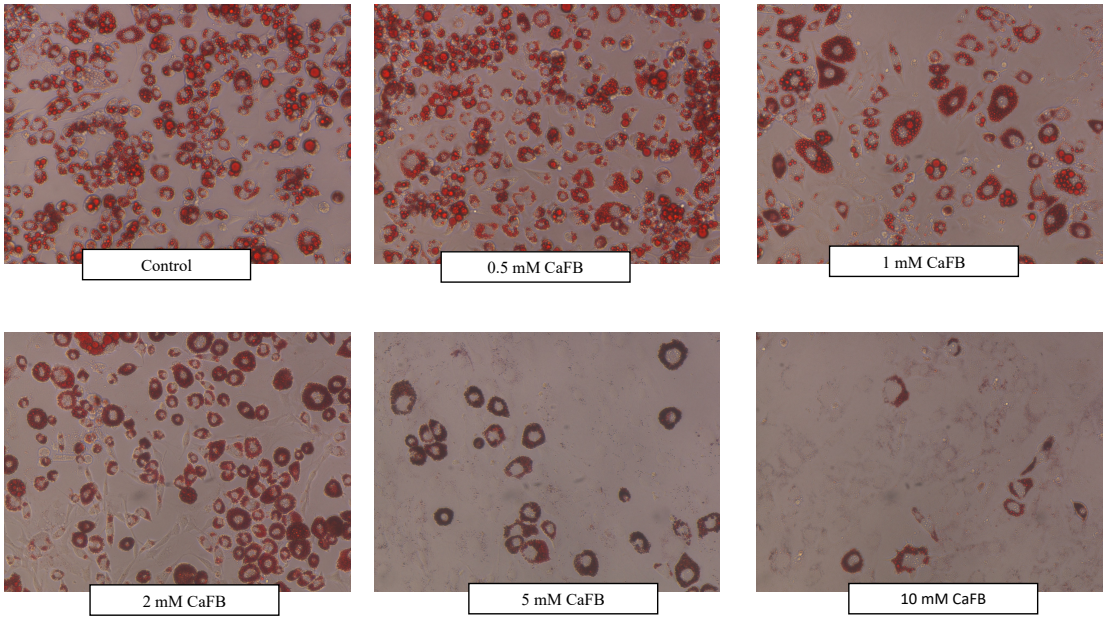
Şekil 12. BA ile 48 saat inkübe edilen adipositlerin WST-1 bulguları**.**

BA'nın 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarının hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (p <0,01). WST-1 sonuçlarına bağlı olarak, her bir bileşiğin canlılığı etkilemeyen 2 dozu (CaFB için 2 mM ve 5 mM ve BA için 100 µg/mL ve 250 µg/mL) sonraki deneysel prosedürlerde kullanılmıştır.

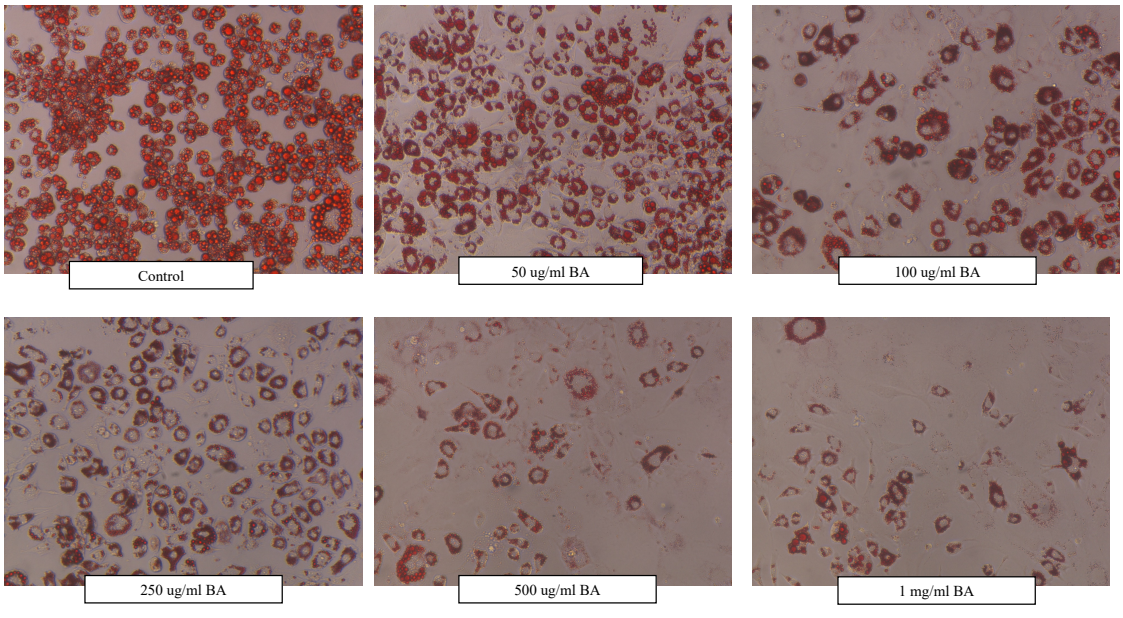
4.3. Boron Bileşiklerinin Lipid Birikimi Üzerindeki Etkisi

Hücreler 0-2. günlerde farklı konsantrasyonlarda boron ile muamele edilmiş ve lipid damlacıklarını görselleştirmek için 8. günde gelişimini tamamlayan olgun adipositlere ORO boyama yapılmıştır. Hücreler inverted mikroskop altında gözlemlenmiştir. Kontrol hücrelerinde yoğun lipid birikimi gözlenirken, borik asit ve

CaFB ile muamele edilen hücrelerde lipidler doza bağlı bir şekilde baskılanmıştır (Şekil 13-14).



Şekil 13. CaFB uygulanan ve uygulanmayan adipositlerde lipitlerin ORO boyama ile gösterimi.



Şekil 14. BA uygulanan ve uygulanmayan adipositlerde lipitlerin ORO boyama ile gösterimi.

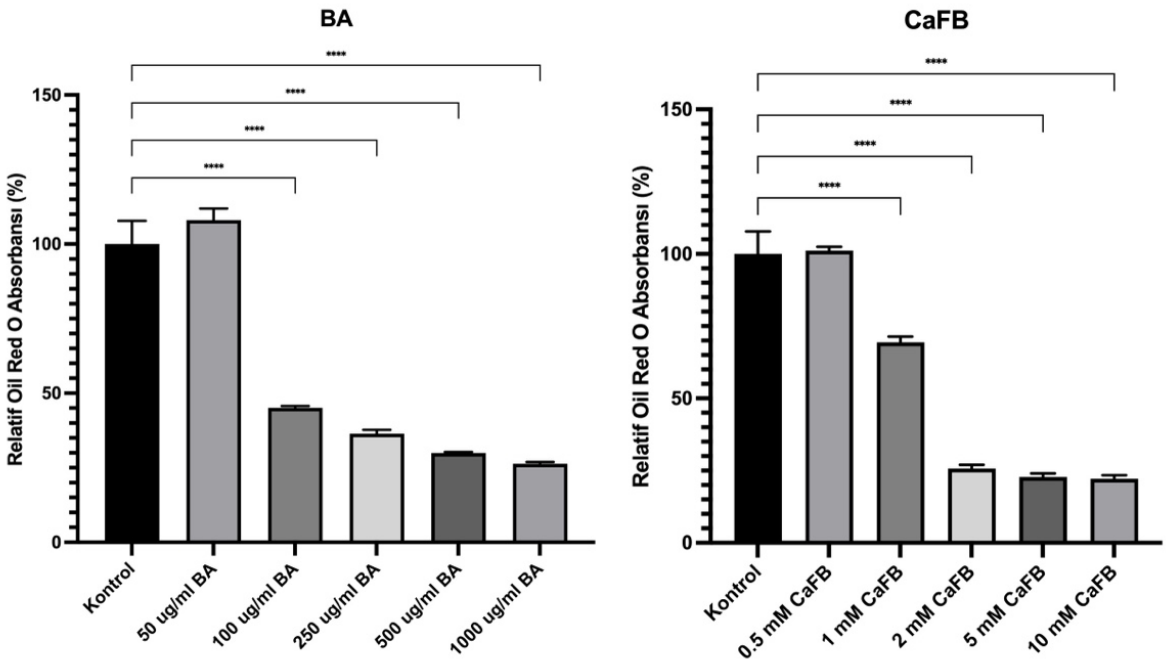
Kantitatif değerlendirme için, izopropanol ile ekstrakte edilen ORO boyanın spektrofotometrik ölçümü gerçekleştirilmiştir (Tablo 16, Tablo 17). Buna göre, 2 mM ve 5 mM CaFB lipid birikimini %75 ve %78 oranında inhibe ederken, BA lipid birikimini sırasıyla 100 µg/mL ve 250 µg/mL dozlarında %55 ve %64 oranında inhibe etmiştir (Şekil 15).

Tablo 16: Adipositlerden ekstrakte edilen ORO boyasının absorbans değerleri (Kontrol ve CaFB Grupları)

Kontrol	**0,5 mM CaFB**	**1 mM CaFB**	**2 mM CaFB**	**5 mM CaFB**	**10 mM CaFB**
0,344	0,377	0,259	0,097	0,084	0,083
0,368	0,37	0,25	0,09	0,08	0,078
0,402	0,38	0,265	0,1	0,09	0,087

Tablo 17: Adipositlerden ekstrakte edilen ORO boyasının absorbans değerleri (Kontrol ve BA Grupları)

Kontrol	**50 µg/ml BA**	**100 µg/ml BA**	**250 µg/ml BA**	**500 µg/ml BA**	**1 mg/ml BA**
0,344	0,419	0,168	0,136	0,111	0,098
0,368	0,39	0,165	0,13	0,11	0,095
0,402	0,4	0,17	0,14	0,113	0,1



Şekil 15. CaFB ve BA uygulanan adipositlerde lipit birikiminin ORO boyama ile kantitatif ölçümü.

Bu sonuçlar borun adipositlerin lipid içeriğini etkili bir şekilde azaltabileceğini ve dolayısıyla obezite için potansiyel bir tedavi seçeneğini temsil edebileceğini göstermektedir.

4.4. Boron Uygulamasının Adiposit Hücrelerinde *SIRT1, SIRT2, C/EBPα* ve *PPARγ* Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

Diferansiyasyonun farklı zamanlarında gen ifade düzeyleri değişkenlik gösterebileceği için, literatürdeki çalışmalar da baz alınarak mRNA analizleri farklılaşmanın 2, 4, 6 ve 8. günlerinde total RNA izolasyonunu takiben yapılmıştır (103,109). *SIRT1, SIRT2, C/EBPα* ve *PPARγ* gen ekspresyon seviyeleri, farklılaşan 3T3-L1 hücrelerine 2 ve 5 mM CaFB ve 100 ve 250 µg/mL BA uygulamasından sonra analiz edilmiştir. Hücreler farklılaşmanın erken aşamasında (0-2. günler) 48 saat boyunca boron ile muamele edilmiştir. Gen ifade düzeyleri adipogenezin 2, 4, 6 ve 8. günlerinde RT-PCR ile belirlenmiş ve GAPDH mRNA düzeylerine normalize edilmiştir. Tüm deney gruplarında hücreler farklılaşma sürecindedir ve CaFB veya BA ile muamele edilmiştir. Kontrol: farklılaşan kontrol hücreleri, C1: 2 mM CaFB, C2: 5

mM CaFB, B1: 100 µg/mL BA, B2: 250 µg/mL BA. Kontrol ile karşılaştırıldığında *P <0,05 **P <0,01.

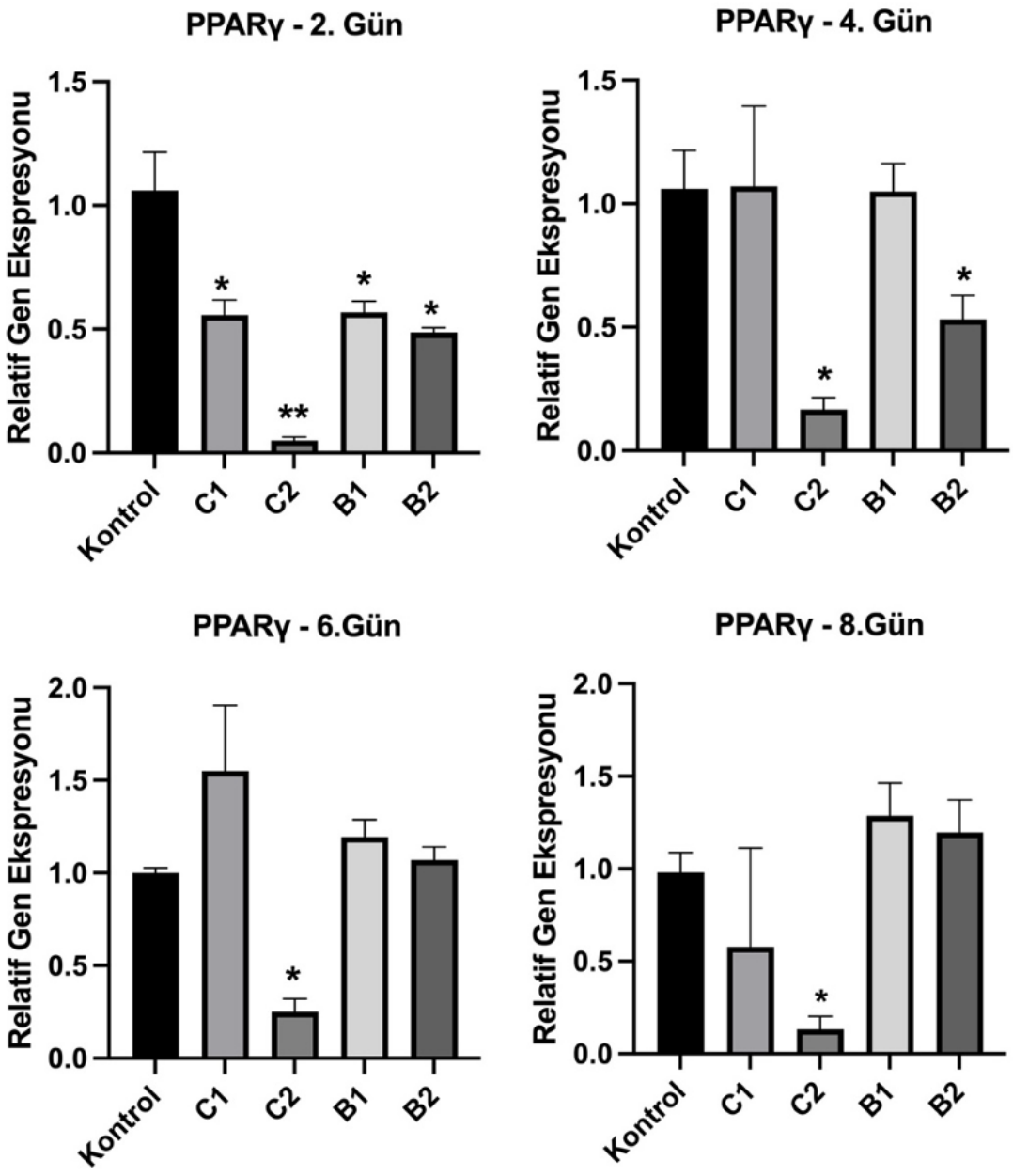
Adipositlere CaFB uygulaması borik asite göre *PPARγ* mRNA seviyelerini inhibe etmede daha etkili bulunmuştur. C2 grubunun *PPARγ* ekspresyon seviyesi üzerindeki inhibitör etkisi 2 günde bir yapılan ölçümlerde anlamlı olarak gözlenmiştir. Borik asit uygulaması *PPARγ* ekspresyonunu sadece 2. ve 4. günlerde inhibe etmiştir (Tablo 18).

Tablo 18: *PPARγ* geninin relatif mRNA değişimleri

Gün	Grup	Değişim (Kat)	p Değeri	Anlamlılık Durumu
2. Gün	C1	**0,55 ↓**	**0,0228**	Anlamlı azalma
	C2	**0,05 ↓**	**0,0031**	Anlamlı azalma
	B1	**0,56 ↓**	**0,0225**	Anlamlı azalma
	B2	**0,48 ↓**	**0,0146**	Anlamlı azalma
4. Gün	C1	1,070	0,9983	Anlamlı değil
	C2	**0,1665 ↓**	**0,0390**	Anlamlı azalma
	B1	1,049	0,9943	Anlamlı değil
	B2	**0,5320 ↓**	**0,0394**	Anlamlı azalma
6. Gün	C1	1,550	0,0642	Anlamlı değil
	C2	**0,2500 ↓**	**0,0200**	Anlamlı azalma
	B1	1,195	0,6396	Anlamlı değil
	B2	1,070	0,9783	Anlamlı değil
8. Gün	C1	0,5767	0,2652	Anlamlı değil
	C2	**0,1300 ↓**	**0,0106**	Anlamlı azalma
	B1	1,287	0,4762	Anlamlı değil
	B2	1,197	0,7304	Anlamlı değil

2. gün mRNA analizlerine göre, *PPARγ* ekspresyonu C1 grubunda 0,55 kat (p <0,05), C2 grubunda 0,05 kat (p <0,01), B1 grubunda 0,56 kat (p <0,05) ve B2 grubunda 0,48 kat (p < 0,05) azalmıştır. 4. günde, *PPARγ* ekspresyonu C2 grubunda 0,16 kat (p <0,05) ve B2 grubunda 0,53 kat (p <0,05) azalmıştır. 6. günde, *PPARγ*

ekspresyonu C2 grubunda 0,25 kat ($p < 0,05$) azalmıştır. 8. günde PPARγ ekspresyonu C2 grubunda 0,13 kat ($p < 0,05$) azalmıştır (Şekil 16).



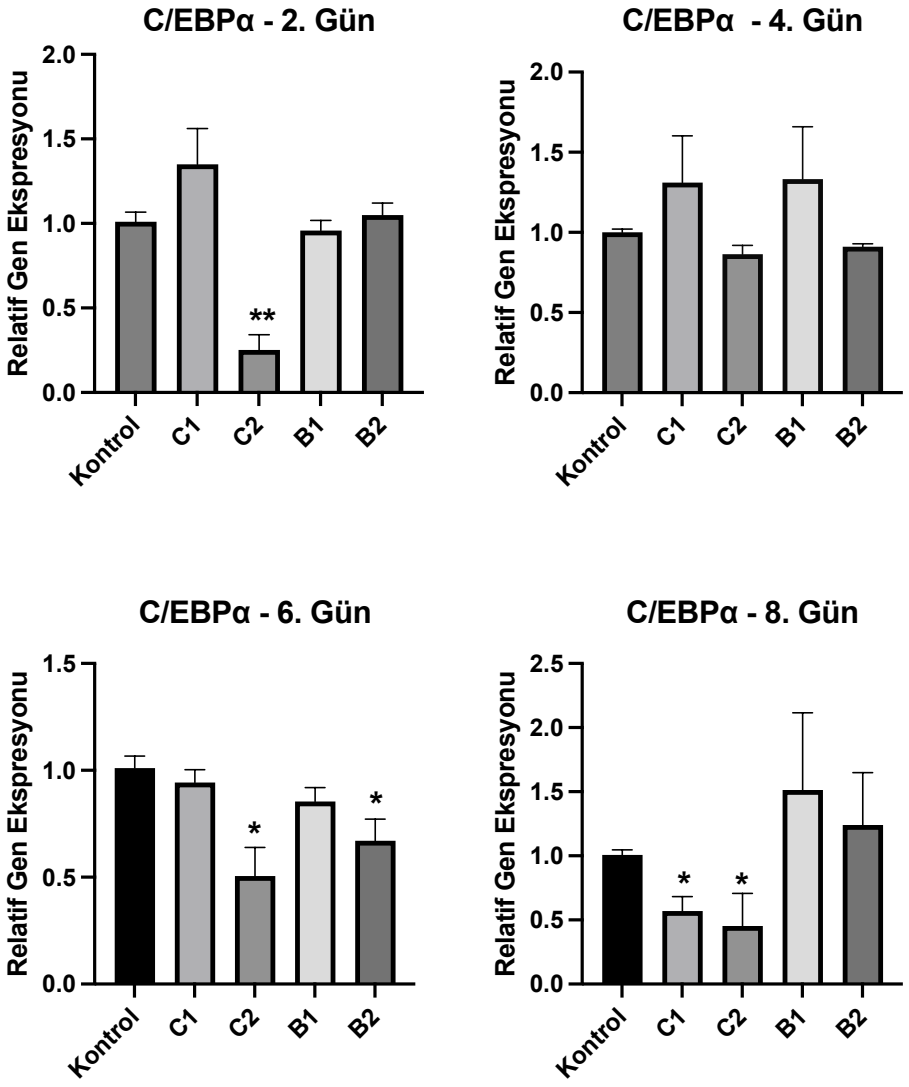
Şekil 16. CaFB ve BA uygulanan hücrelerde *PPARγ* geni relatif mRNA bulguları.

Adipositlere CaFB uygulaması borik asite göre *C/EBPα* mRNA seviyelerini inhibe etmede daha etkili bulunmuştur. C2 grubunun *C/EBPα* ekspresyonu üzerindeki inhibitör etkisi 2, 6 ve 8. günlerde anlamlı olarak gözlenmiştir (Tablo 19).

Tablo 19: *C/EBPα* geninin relatif mRNA değişimleri

Gün	Grup	Değişim (Kat)	p Değeri	Anlamlılık Durumu
2. Gün	C1	1,35	0,0800	Anlamlı değil
	C2	**0,25 ↓**	**0,0034**	Anlamlı azalma
	B1	0,95	0,9600	Anlamlı değil
	B2	1,05	0,9800	Anlamlı değil
4. Gün	C1	1,310	0,2308	Anlamlı değil
	C2	0,8637	0,8126	Anlamlı değil
	B1	1,333	0,1857	Anlamlı değil
	B2	0,9107	0,9459	Anlamlı değil
6. Gün	C1	0,9000	0,7063	Anlamlı değil
	C2	**0,50 ↓**	**0,0188**	Anlamlı azalma
	B1	0,8000	0,2114	Anlamlı değil
	B2	**0,60 ↓**	**0,0349**	Anlamlı azalma
8. Gün	C1	**0,5700 ↓**	**0,0287**	Anlamlı azalma
	C2	**0,4533 ↓**	**0,0103**	Anlamlı azalma
	B1	1,514	0,2616	Anlamlı değil
	B2	1,241	0,8056	Anlamlı değil

2. gün mRNA analizlerine göre, C2 grubunda *C/EBPα* ekspresyonu 0,25 kat ($p < 0,01$) azalmıştır. 6. günde, *C/EBPα* ekspresyonu C2 grubunda 0,50 kat ($p < 0,05$) ve B2 grubunda 0,67 kat ($p < 0,05$) azalmıştır. 8. günde, *C/EBPα* ekspresyonu C1 grubunda 0,57 kat ($p < 0,05$) ve C2 grubunda 0,45 kat ($p < 0,05$) azalmıştır (Şekil 17).

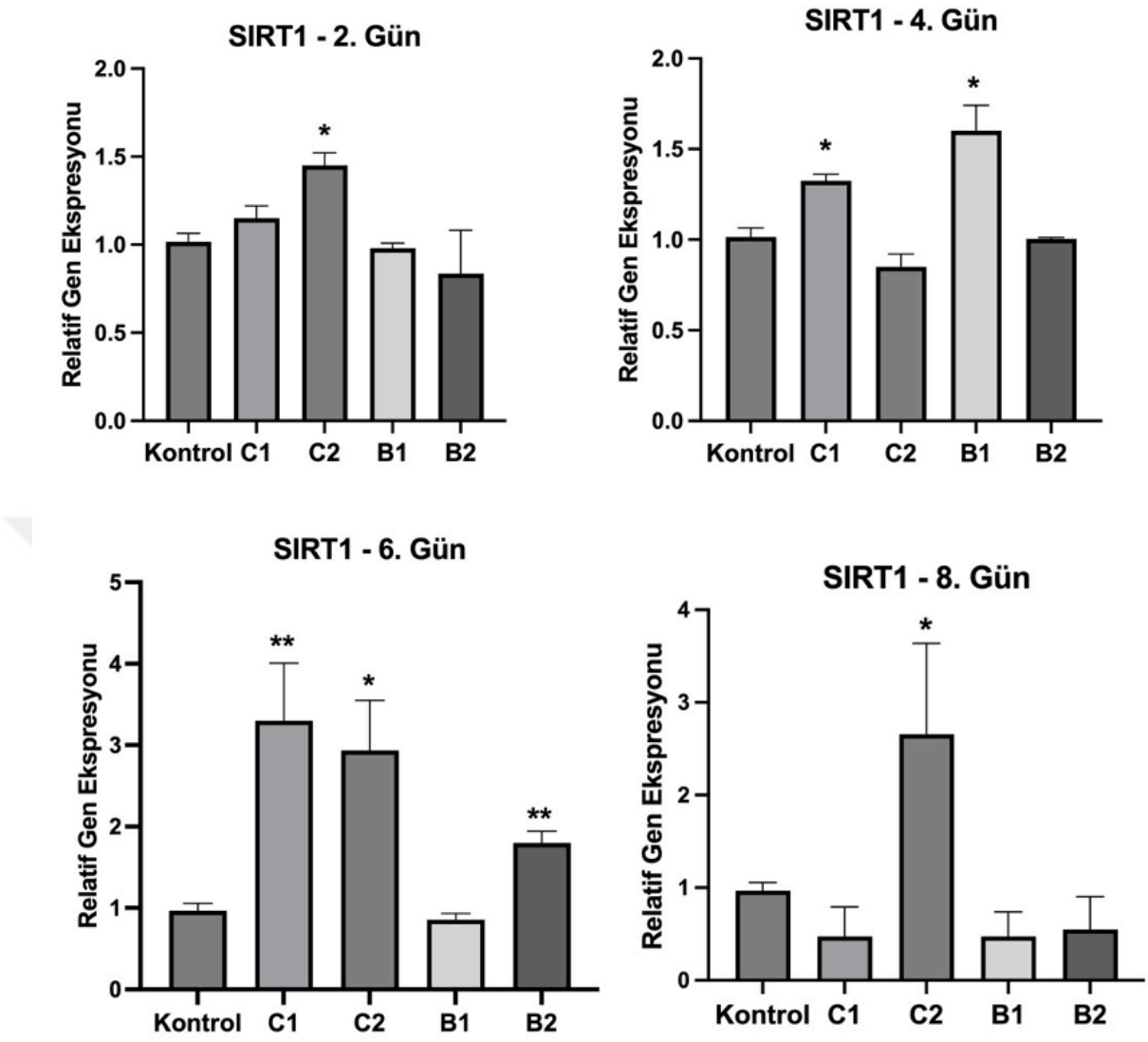


Şekil 17. CaFB ve BA uygulanan hücrelerde *C/EBPα* geni relatif mRNA bulguları.

SIRT1 ekspresyon seviyeleri 4. günden sonra pik yapmıştır. 2. gün mRNA analizlerine göre, *SIRT1* ekspresyonu C2 grubunda 1,45 kat ($p < 0,01$) artmıştır. 4. günde *SIRT1* ekspresyonu C1 grubunda 1,3 kat ($p < 0,05$) ve B1 grubunda 1,6 kat ($p < 0,05$) artmıştır. 6. günde *SIRT1* ekspresyonu C1 grubunda 3,3 kat ($p < 0,01$), C2 grubunda 2,9 kat ($p < 0,05$) ve B2 grubunda 1,8 kat ($p < 0,01$) artmıştır. 8. günde, *SIRT1* ekspresyonu C2 grubunda 2,6 kat ($p < 0,05$) artmıştır (Tablo 20, Şekil 18).

Tablo 20: *SIRT1* geninin relatif mRNA değişimleri

Gün	Grup	Değişim (Kat)	p Değeri	Anlamlılık Durumu
2. Gün	C1	1,150	0,6640	Anlamlı değil
	C2	**1,450 ↑**	**0,0457**	Anlamlı artış
	B1	0,9800	0,9942	Anlamlı değil
	B2	0,8350	0,4636	Anlamlı değil
4. Gün	C1	**1,325 ↑**	**0,0172**	Anlamlı artış
	C2	0,8500	0,0888	Anlamlı değil
	B1	**1,600 ↑**	**0,0110**	Anlamlı artış
	B2	1,005	0,9903	Anlamlı değil
6. Gün	C1	**3,300 ↑**	**0,0100**	Anlamlı artış
	C2	**2,935 ↑**	**0,0181**	Anlamlı artış
	B1	0,8550	0,4677	Anlamlı değil
	B2	**1,800 ↑**	**0,0016**	Anlamlı artış
8. Gün	C1	0,4731	0,7662	Anlamlı değil
	C2	**2,656 ↑**	**0,0261**	Anlamlı artış
	B1	0,4729	0,7659	Anlamlı değil
	B2	0,5505	0,8484	Anlamlı değil

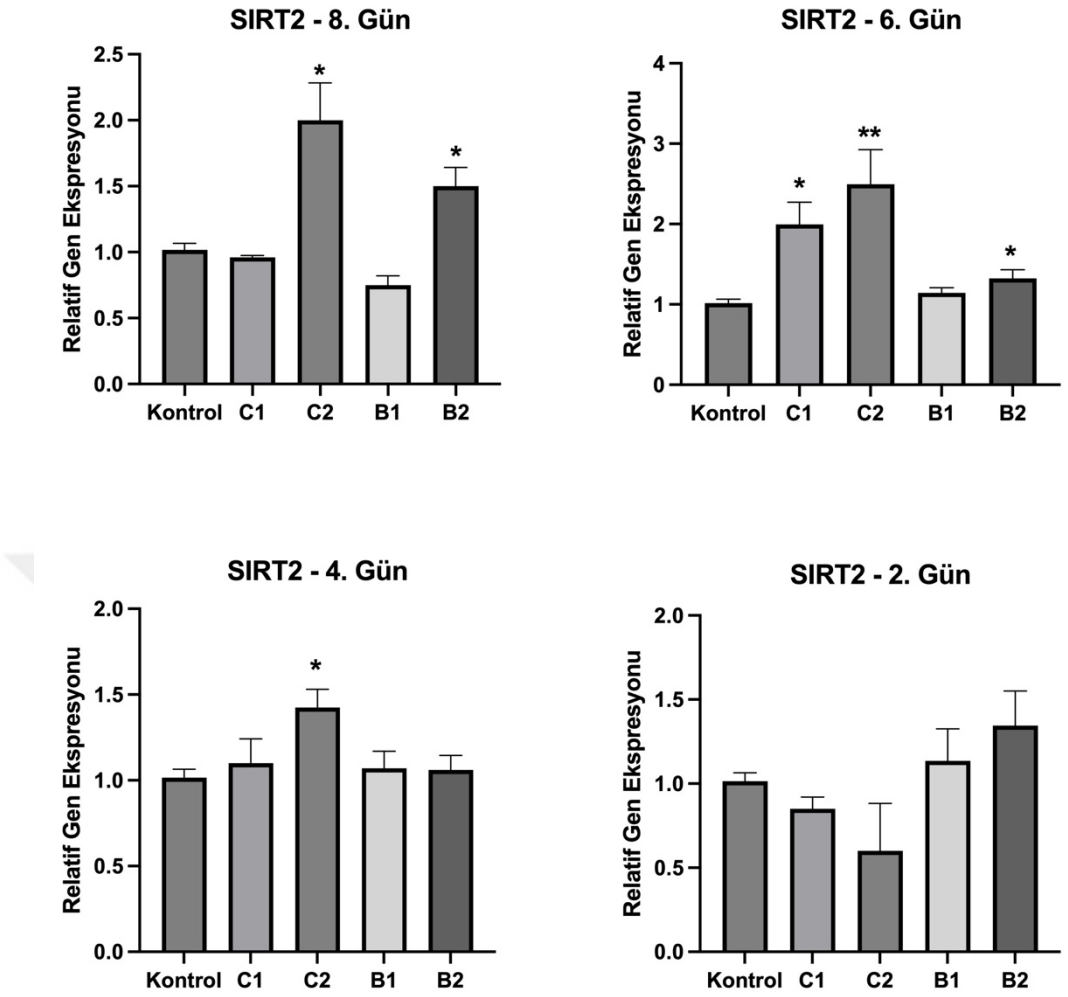


Şekil 18. CaFB ve BA uygulanan hücrelerde *SIRT1* geni relatif mRNA bulguları.

SIRT2 gen ifadesinin en yüksek düzeylere 6.günde ulaştığı görülmektedir. 4. gün mRNA analizlerine göre, *SIRT2* ekspresyonu C2 grubunda 1,4 kat ($p < 0,01$) artmıştır. 6. günde *SIRT1* ekspresyonu C1 grubunda 1,9 kat ($p < 0,05$), C2 grubunda 2,4 kat ($p < 0,01$) ve B2 grubunda 1,3 kat ($p < 0,05$) artmıştır. 8. günde *SIRT1* ekspresyonu C2 grubunda 2,0 kat ($p < 0,05$) ve B2 grubunda 1,5 kat ($p < 0,05$) artmıştır (Tablo 21, Şekil 19).

Tablo 21: *SIRT2* geninin relatif mRNA değişimleri

Gün	Grup	Değişim (Kat)	p Değeri	Anlamlılık Durumu
2. Gün	C1	0,8500	0,7796	Anlamlı değil
	C2	0,6000	0,1878	Anlamlı değil
	B1	1,135	0,9035	Anlamlı değil
	B2	1,345	0,3205	Anlamlı değil
4. Gün	C1	1,100	0,8134	Anlamlı değil
	C2	**1,425 ↑**	**0,0276**	Anlamlı artış
	B1	1,070	0,9450	Anlamlı değil
	B2	1,060	0,9714	Anlamlı değil
6. Gün	C1	**1,995 ↑**	**0,0258**	Anlamlı artış
	C2	**2,495 ↑**	**0,0045**	Anlamlı artış
	B1	1,145	0,2944	Anlamlı değil
	B2	**1,325 ↑**	**0,0449**	Anlamlı artış
8. Gün	C1	0,9600	0,9253	Anlamlı değil
	C2	**2,000 ↑**	**0,0158**	Anlamlı artış
	B1	0,7500	0,1121	Anlamlı değil
	B2	**1,500 ↑**	**0,0244**	Anlamlı artış

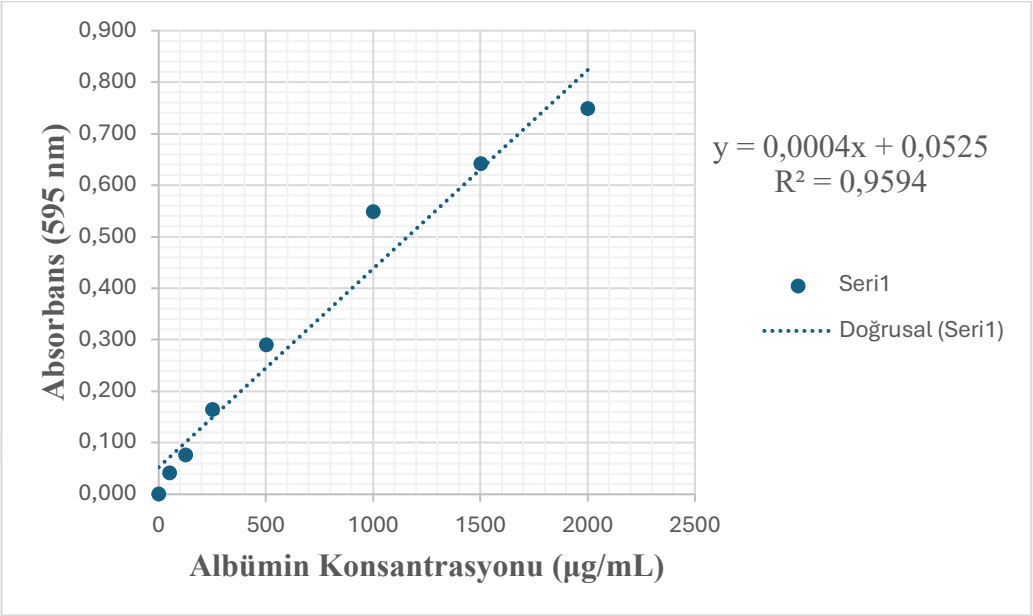


Şekil 19. CaFB ve BA uygulanan hücrelerde *SIRT2* geni relatif mRNA bulguları.

4.5. Boron Uygulamasının Adiposit Hücrelerinde SIRT1, SIRT2, C/EBPα ve PPARγ Protein Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

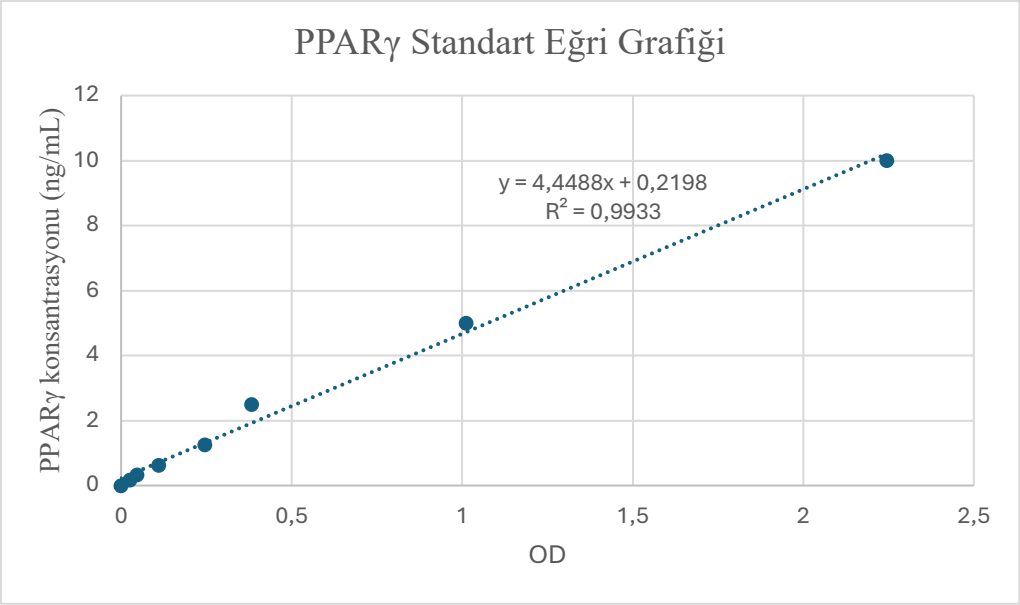
SIRT1, SIRT2, C/EBPα ve PPARγ protein ekspresyonu seviyeleri, farklılaşan 3T3-L1 hücrelerine 5 mM CaFB ve 250 µg/mL BA uygulanmasının ardından ELISA testleri ile analiz edilmiştir. Hücreler farklılaşmanın erken aşamasında (0-2. günler) 48 saat boyunca boron ile muamele edilmiştir. 8. günde hücrelerden protein izolasyonu yapılmıştır. Hücre lizatlarından Bradford yöntemine göre total protein tayini yapılmış. Albümin standart konsantrasyonuna göre her bir örneğin protein konsantrasyonu belirlenmiştir (Şekil 20). Her kuyuya eşit miktarda protein yüklenmesi sonuçların daha doğru ve güvenilir olabilmesi için önemli olup, bu çalışmada örnekler seyreltilerek eşit

konsantrasyonda proteinle çalışılmıştır. Protein ifadesi total protein düzeyine normalize edilmiştir.

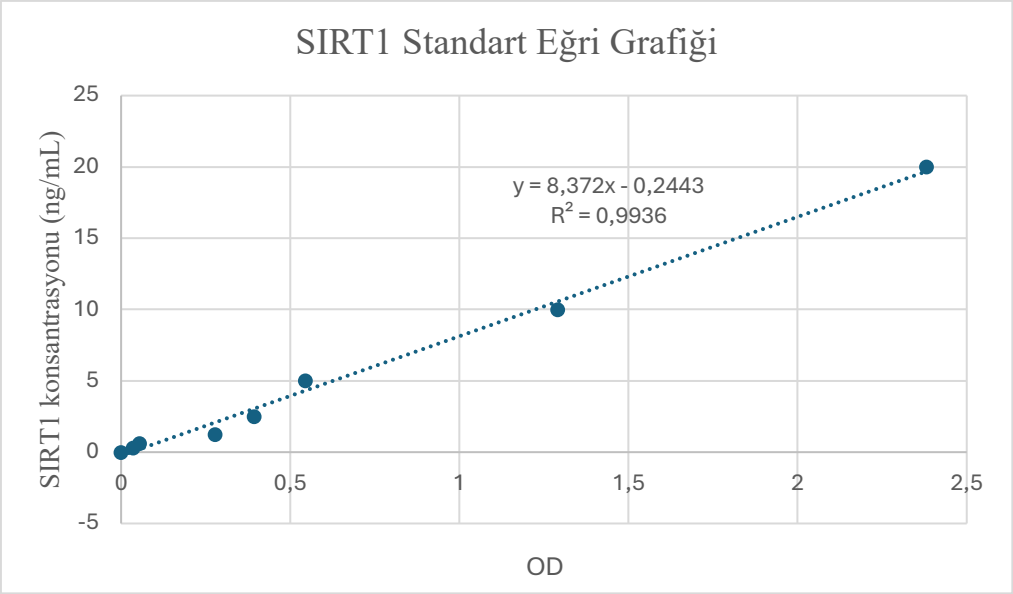


Şekil 20. Albümin standart kalibrasyon eğrisi.

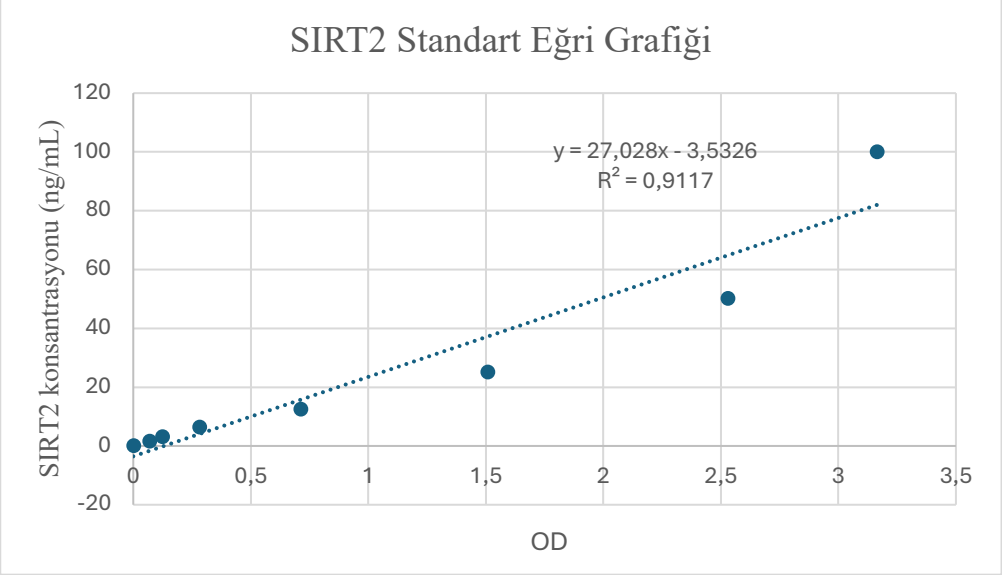
Çalışılacak her bir protein için konsantrasyonu bilinen standartlar kullanılarak standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Çalışılan örneklerin konsantrasyonu standart eğri grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 21-24).



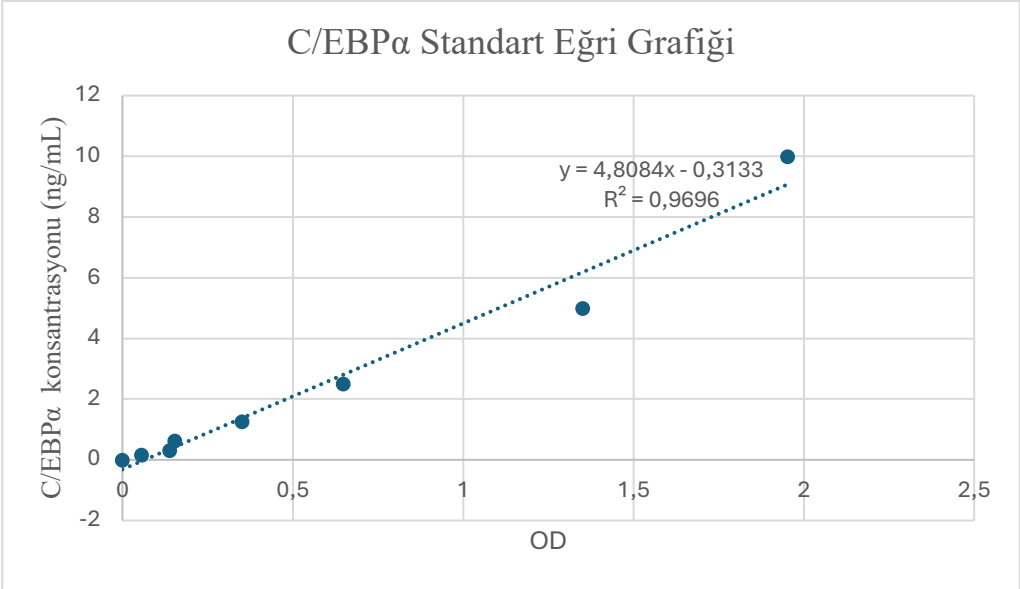
Şekil 21. PPARγ standart kalibrasyon eğrisi.



Şekil 22. SIRT1 standart kalibrasyon eğrisi.

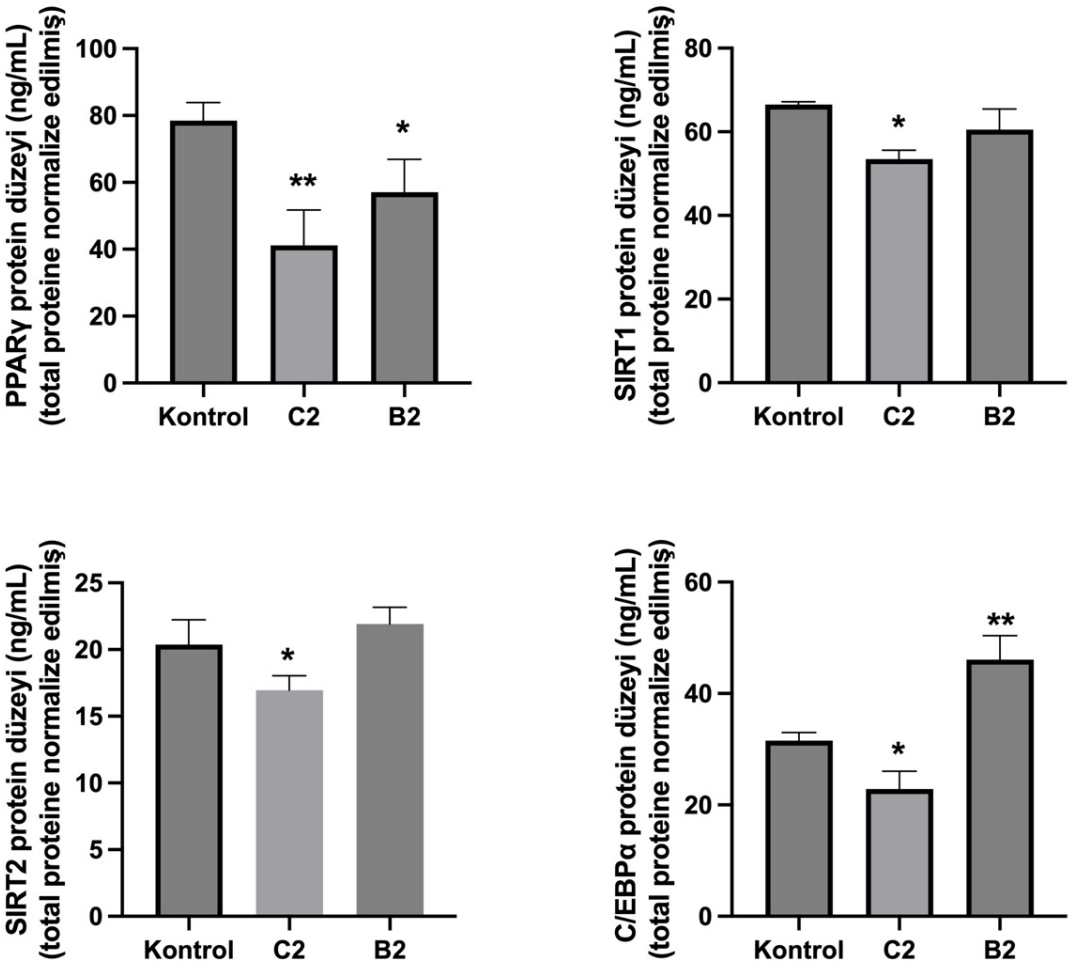


Şekil 23. SIRT2 standart kalibrasyon eğrisi.



Şekil 24. C/EBPα standart kalibrasyon eğrisi.

PPARγ protein ifadesi CaFB ve BA uygulamalarından sonra sırasıyla 37,32 ($p < 0,01$) ve 21,38 ng/mL ($p < 0,05$) azalmıştır. SIRT1 protein ekspresyonu CaFB uygulamasından sonra 13 ng/mL ($p < 0,05$) azalmıştır. SIRT2 protein ifadesi CaFB uygulamasından sonra 3,4 ng/mL ($p < 0,05$) azalmıştır. C/EBPα protein ifadesi CaFB uygulamasından sonra 8,6 ng/mL ($p < 0,05$) azalmış ve BA ile muameleden sonra 14,51 ng/mL ($p < 0,01$) artmıştır (Şekil 25).

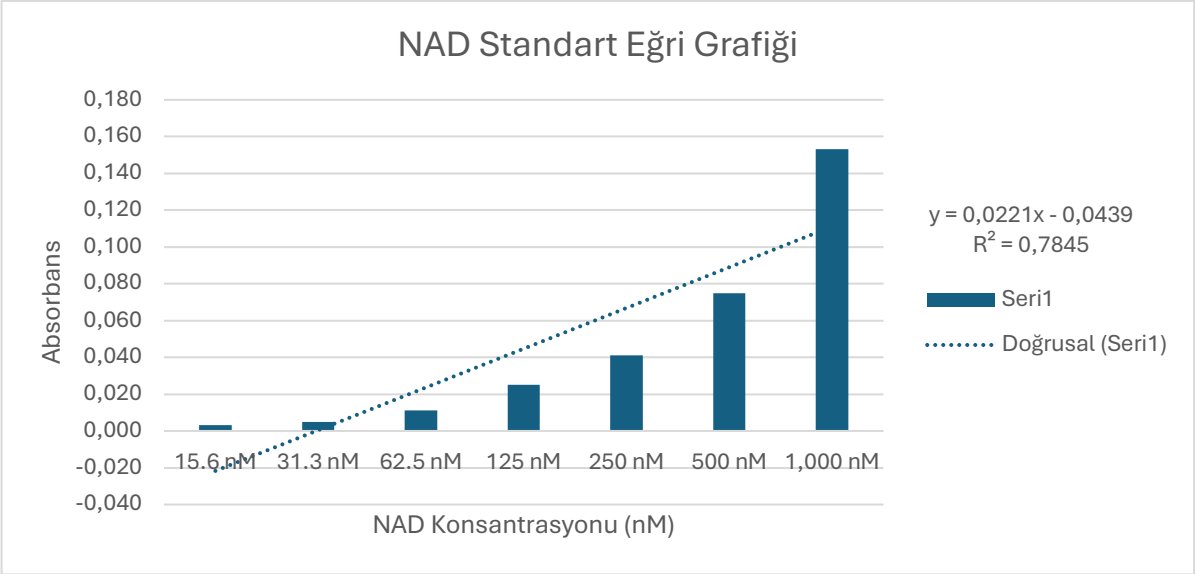


Şekil 25. CaFB ve BA uygulanan hücrelerde PPARγ, SIRT1, SIRT2 ve C/EBPα protein ekspresyonu bulguları.

4.6. CaFB ve BA Uygulamasının Hücresel NAD Düzeyine Etkisi

Farklılaşma fazındaki 3T3-L1 adipositlere 48 saat boron uygulanmıştır. Standart eğri grafiği konsantrasyonu bilinen NAD standartları kullanılarak 450 nm'de ölçülen absorbans değerleri ile oluşturulmuştur (Şekil 26), (Tablo 22). Bu grafikten elde edilen formüle göre örneklerin toplam NAD seviyeleri hesaplanmıştır.

Toplam hücresel NAD (nM) = (düzeltilmiş absorbans- y-ekseni kesen nokta)/eğim formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

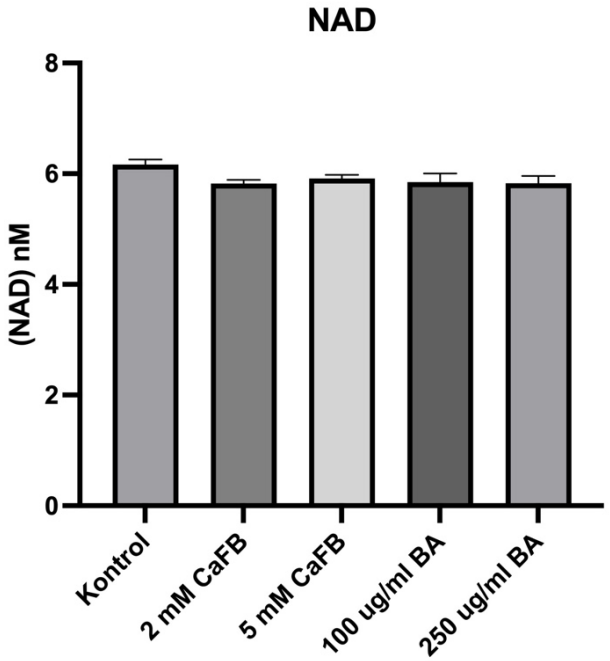


Şekil 26. NAD standart eğri grafiği.

Tablo 22: NAD Standart eğri grafiğini oluşturan absorbans değerleri

NAD Konsantrasyonu	1. Tekrar	2. Tekrar	Ortalama Absorbans
1,000 nM	0,199	0,201	0,200
500 nM	0,119	0,125	0,122
250 nM	0,087	0,088	0,088
125 nM	0,075	0,069	0,072
62.5 nM	0,057	0,059	0,058
31.3 nM	0,051	0,052	0,052
15.6 nM	0,049	0,050	0,050
0	0,047	0,047	0,047

Farklılaşmaya hazır hücreler 0. günde, 3T3-L1 adipositleri 48 saat boyunca 2 mM CaFB, 5 mM CaFB, 100 µg/mL BA ve 250 µg/mL BA ile muamele edilmiştir. Hücresel NAD/NADH ölçüm sonuçlarına göre, kontrol ve boron ile muamele edilen gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 27).



Şekil 27. CaFB ve BA'nın 3T3-L1 adipositlerindeki NAD seviyelerine etkisi.

4.7. CaFB ve BA Bileşiklerinin SIRT1 Aktivitesine Etkisi

SIRT1 enzim aktivitesini doğrudan ve kantitatif olarak ölçmek için biyokimyasal bir test kullanılmıştır. % inhibisyon/aktivasyon belirlemek için hücre içermeyen reaksiyon ortamında CaFB ve BA bileşikleri test edilmiştir. Sonuçlar 360/460 nm'de floresans okuma ile belirlenmiştir. Her bir örnek için örnek değeri %100 başlangıç aktivitesi değerinden çıkarılmış ve sonuç %100 başlangıç aktivitesi değerine oranlanarak ifade edilmiştir (Tablo 23).

Tablo 23: Floresans ölçüm değerleri

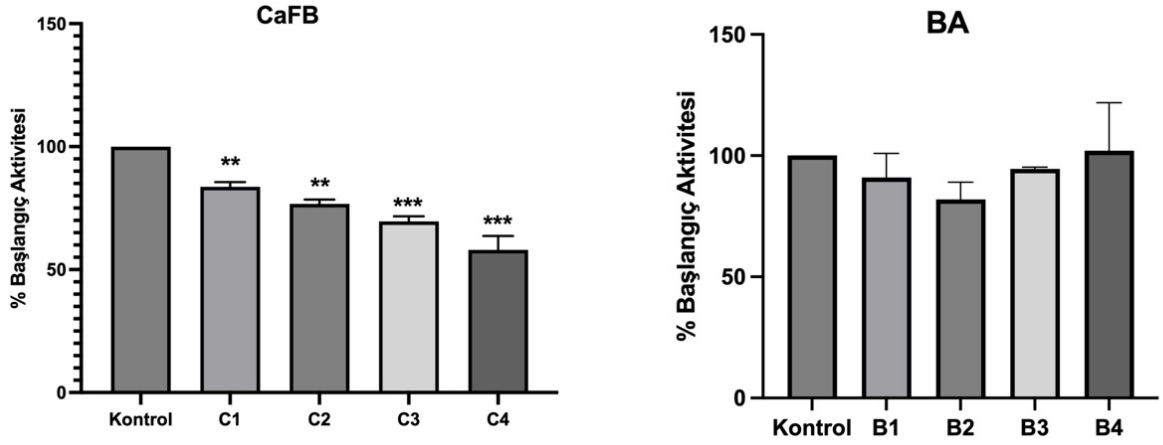
CaFB Grubu	Floresans Ölçüm Değeri	BA Grubu	Floresans Ölçüm Değeri
%100	7949	%100	7949
C1	6628	B1	7764
C2	6054	B2	7331
C3	5517.5	B3	7514
C4	4609.5	B4	8239

Bu bulgulara göre, CaFB bileşiğinin SIRT1 aktivitesini doza bağlı bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. SIRT1 aktivitesi C1 grubunda %17 ($p < 0,01$), C2 grubunda %24 ($p < 0,01$), C3 grubunda %31 ($p < 0,001$) ve C4 grubunda %42 ($p < 0,001$) oranında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibe edilmiştir (Tablo 24).

Tablo 24: CaFB grubunun SIRT1 inhibisyonu oranları

Grup	İnhibisyon (%)	İstatistiksel Anlamlılık
C1	17%	$p < 0,01$
C2	24%	$p < 0,01$
C3	31%	$p < 0,001$
C4	42%	$p < 0,001$

BA uygulanan grupta SIRT1 enzim aktivitesinde azalma eğilimi gözlemlenmiş olmakla birlikte, bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuç, BA'nın SIRT1 aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığını ya da uygulanan doz ve sürenin biyolojik yanıt oluşturmak için yetersiz kaldığını düşündürmektedir (Şekil 28).



Şekil 28. CaFB ve BA'nın SIRT1 enzim aktivite düzeyine etkisi.

C1: 2 mM CaFB, C2: 5 mM CaFB, C3: 10 mM CaFB, C4: 20 mM CaFB, B1: 100 µg/mL BA, B2: 250 µg/mL BA, B3: 500 µg/mL BA, B4: 1000 µg/mL BA. Veriler üç bağımsız deneyi temsil etmektedir ve ortalama ± SD'yi göstermektedir.

Karşılaştırmalar ANOVA ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında **P <0,01 *** P <0,001.

5.TARTIŞMA

Dünyanın en yüksek Boron rezervlerine sahip olan Türkiye için Boron, önemli bir ekonomik gelir kaynağı potansiyeline sahiptir. Topraklarımızda var olan Boron, su kaynakları gibi doğal yollardan beslenme sistemimize dahil olma ihtimaline sahiptir. Bu nedenlerle dünyada olduğu gibi ülkemizde de çalışmalar Boron'un canlı organizmalar üzerindeki etkisinin moleküler mekanizmalarını aydınlatmayı hedeflemektedir. Literatürde borun, özellikle besin takviyesi formunda uygulandığında, kısa ve uzun vadede vücut ağırlığında azalma sağladığına yönelik bulgular mevcuttur (88, 113). Ancak bu etkinin altında yatan moleküler mekanizmalar henüz net olarak ortaya konulamamıştır. Tez çalışmamızda, borun yağ hücreleri üzerindeki potansiyel etkilerini aydınlatmak amacıyla gen ekspresyon düzeyinde analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular, farklılaşan 3T3-L1 adiposit hücrelerine BA ve CaFB uygulamasının lipit birikimini ve adipojenik genlerin ekspresyonlarını anlamlı düzeyde baskıladığını göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan boron bileşiklerinin adipogenez sürecini inhibe edebileceğine ve dolayısıyla obeziteye karşı potansiyel terapötik ajanlar olabileceğine işaret etmektedir. Bulgularımız, borun lipit metabolizması üzerindeki etkilerinin hücresel düzeyde anlaşılmasına katkı sağlamaktadır.

Doğan ve arkadaşları, 3T3-L1 adiposit hücrelerine 1 mg/mL konsantrasyonunda BA uyguladıklarında lipit birikiminin baskılandığını göstermişlerdir (103). BA uygulaması sonucunda elde ettiğimiz bulgular, Doğan ve arkadaşlarının bulgularına göre, 1 mg/mL konsantrasyonundaki BA, 3T3-L1 hücreleri için toksisite oluşturmayan, güvenli bir doz olarak rapor edilmiştir. Ancak, bizim çalışmamızda aynı konsantrasyondaki BA hücre canlılığını %65.17 oranına kadar düşürerek sitotoksik etki göstemiştir, bununla birlikte Doğan ve ark.'nın çalışmasıyla uyumlu olarak lipit birikimini azaltmıştır. Bulgular arasındaki bu fark BA'nın hücreler üzerindeki biyolojik etkilerinin, kullanılan deneysel protokollere ve koşullara bağlı olarak önemli ölçüde değişkenlik gösterebileceğini düşündürmektedir. ORO boyama bulgularımız, 500 ve 1000 µg/mL dozlarında uygulanan BA'nın lipit birikimini daha güçlü şekilde inhibe ettiğini göstermesine rağmen, bu dozların hücre canlılığı üzerinde olumsuz etkiler göstermesi nedeniyle deneysel protokollerimizde kullanımı uygun

bulunmamıştır. 100 ve 250 μg/mL konsantrasyonlarında uygulanan BA'nın hem lipit birikimini baskıladığı hem de hücrelerde sitotoksisiteye yol açmadığı belirlenmiş ve bu dozlar deneysel prosedürlerde tercih edilmiştir.

CaFB bileşiği ile yaptığımız çalışmalarda elde edilen bulgular, adiposit hücrelerinde yapılan literatürdeki ilk çalışmalar olup, bu bağlamda yeni temel bilgiler sunmaktadır (15). Bu açıdan, çalışmamız hem özgün olup hem de literatüre önemli katkılar sunan bulgular elde etmiştir. Kısaçam ve arkadaşlarının çalışmasında, kolon kanseri hücre hattı olan CaCo-2 hücrelerinde, CaFB'nin sitotoksik etkileri detaylı olarak araştırılmış ve 10 mM'dan daha yüksek dozların hücreler üzerinde toksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (108). Ancak bizim çalışmamızda, CaFB bileşiğinin 3T3-L1 adiposit hücrelerine farklılaşma sürecinde uygulanan 20 mM'a kadar olan konsantrasyonlarında herhangi bir sitotoksik etki gözlemlenmemiştir. Etkili minimum doz prensibine göre, çalışmamızda değerlendirdiğimiz konsantrasyonlar arasında 2 mM ve 5 mM CaFB dozları, lipit birikimini anlamlı şekilde baskılama etkisi gösterdiği için optimum dozlar olarak belirlenmiştir. CaFB'nin adiposit hücrelerinde lipit metabolizması üzerindeki etkilerini incelemek için CaFB'nin 20 mM'a kadar olan konsantrasyonları çalışmaya dahil edilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonların 3T3-L1 hücrelerinde canlılığa etkisi bilinmemektedir, bu durum çalışmanın kısıtlı yönlerinden sayılabilir.

Obezitenin moleküler düzeyde araştırıldığı adipogenez çalışmalarında, *C/EBPα* ve *PPARγ* araştırılan genler arasında yer almaktadır. Bu genler, adiposit diferansiyasyonu ve lipit birikiminin düzenlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Doğal anti-obezite ajanlarının etkinliğini araştıran birçok çalışmada (12), *C/EBPα* ve *PPARγ*'nin gen ekspresyon düzeylerinin inhibe edilmesinin, obezite ile ilişkili metabolik bozuklukların azaltılmasında önemli bir strateji olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir. Tez çalışmamızda, CaFB'nin fare adipositlerinde *SIRT1, SIRT2, PPARγ* ve *C/EBPα*'nın mRNA ve protein ekspresyonu üzerindeki etkileri in vitro olarak araştırılmış ve elde edilen bulgular, bu konuda yapılan ilk çalışmayı oluşturmuştur (15). Literatürdeki bulgulara benzer şekilde, çalışmamızda da BA ve CaFB bileşiklerinin belirli konsantrasyonlarda, *C/EBPα* ve *PPARγ* genlerinin mRNA ve protein ekspresyonunu anlamlı bir şekilde baskıladığı tespit edilmiştir (102, 104, 114,

115). Bu inhibisyon, BA ve CaFB bileşiklerinin anti-obezite etkilerini gösteren önemli bir bulgu olarak öne çıkmaktadır. 5 mM CaFB'nin adipositlerdeki gen ekspresyonu üzerindeki etkisi, 2, 4, 6 ve 8. günlerde yapılan ölçümlerle değerlendirilmiş ve tüm bu zaman dilimlerinde BA'ya kıyasla daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 15-16). BA'nın adipogenezin erken evrelerinde inhibe edici etkiler gösterdiği, ancak geç fazda bu etkilerin yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu durumun, düşük doz BA'nın adipogenezi baskılamak için yetersiz kalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Boron türevlerinden borik asit ve sodyum pentaborat pentahidratın 3T3-L1 hücrelerinde antiadipojenik rolü araştırılmış, adipogenezin ana transkripsiyonel faktörleri olan *PPARγ* ve *C/EBPα*'yı baskılayarak lipid birikimini ve trigliserit sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (103). Boron *β-katenin, AKT* ve *ERK* sinyal yollarını düzenleyerek mitotik klonal genişlemeyi engellemiştir. Bu bulgular, boron bileşiklerinin obezite ve ilişkili hastalıkların önlenmesi veya tedavisinde potansiyel rol oynayabileceğini düşündürmektedir (103). Boron glisin monoester (BGM) adlı yeni sentezlenen bir boron bileşiği, 3T3-L1 adipositlerinde yağ birikimini azaltmış, oksidatif stresi düşürmüş ve apoptozu artırmıştır. BGM'nin bu etkileri, *PPARγ* ve *CTRP3* genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek lipogenez sürecini baskılamasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu sonuçlar, BGM'nin obezite tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir (115). İnsan yağ dokusu kaynaklı kök hücreler (hADSCs) kullanılarak yapılan bir çalışmada, sodyum pentaborat pentahidrat (NaB) uygulamasının adipogenez sürecini doz bağımlı olarak baskıladığı bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda NaB, lipid birikimini azaltmış ve adipogenezle ilişkili genlerin ekspresyonunu düşürmüştür. Bu etkiler, hücrelerde belirgin bir sitotoksisite olmaksızın gözlemlenmiştir (105). Boron bileşiklerinin anti-adipojenik aktivitesinin altında yatan moleküler mekanizmaların büyük ölçüde anlaşılamadığı rapor edilmekte ve ileri moleküler çalışmalara yön verilmektedir.

Sirtüin'ler, kalori kısıtlaması ve açlık gibi stres koşulları altında aktive olan NAD+ bağımlı deasetilazlardır (117). Farklılaşan adipositlerde *SIRT1*'in yukarı regülasyonunun lipolize, yağ mobilizasyonuna ve *PPARγ* ekspresyonunu baskılayarak adipojenik farklılaşmanın inhibisyonuna yol açtığı gösterilmiştir (10, 117, 118). *SIRT1*'in adipojenik transkripsiyonel kaskaddaki negatif rolüne benzer şekilde,

SIRT2'nin aşırı ekspresyonu farklılaşmayı engeller ve *PPARγ* ekspresyonunun azalmasıyla ilişkilidir (45). *PPARγ* aktivitesinin inhibisyonunun arkasındaki mekanizmaların anlaşılması da gelecekteki çalışmalar için kritik öneme sahiptir (12). Çalışmamızda, 5 mM CaFB ile muamele edilen hücrelerde adipogenezin 6. ve 8. günlerinde *SIRT1* mRNA ölçümlerinde kontrole kıyasla 3 kat artış gözlenmiştir. Benzer şekilde, 5 mM CaFB ile muamele edilen deney grubu için *SIRT2* mRNA sonuçları 4., 6. ve 8. gün ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. BA uygulaması adipogenezin 4. ve 6. günlerinde *SIRT1* ekspresyonunu önemli ölçüde artırmıştır. BA uygulanan grupta *SIRT2* mRNA seviyeleri adipogenezin 6. ve 8. günlerinde CaFB kadar olmasa da daha yüksek bulunmuştur. Bulgularımız, *SIRT1* ve *SIRT2* ekspresyon düzeylerinde artış eğilimi gözlenirken, *PPARγ* ve *C/EBPα* ekspresyon düzeylerinde azalma eğilimi ile bu durumun ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Literatürle uyumlu olarak, elde ettiğimiz sonuç *SIRT1* ve *SIRT2*'nin adipogenez kaskadında *PPARγ* ile antagonistik olarak çalıştığını göstermektedir (97, 119, 120). Çalışmamızda, boron uygulamasının mRNA analizinin aksine SIRT1 ve SIRT2 protein seviyelerini düşürdüğü bulunmuştur. Bu tür tutarsız sonuçlar tipik olarak transkript ve protein ürünü arasındaki farklı düzenleme seviyelerine bağlanmaktadır (122). *SIRT1* aktivasyonunun adipogenezi azaltarak farmakolojik potansiyele sahip olabileceği (11) ve *SIRT1* inhibisyonunun hepatik glukoneogenezi baskılayarak kan glukozunu kontrol etmek için değerli bir terapötik yaklaşım olabileceği bilinmektedir (40, 122). Bu bağlamda, *SIRT1*'in hem aktivasyonu hem de inhibisyonu diyabetik koşullarda farmakolojik yaklaşımlar olarak dikkate alınmaya değer gösterilmektedir (124).

Tez çalışmamızda *SIRT1* ve *SIRT2*'nin mRNA düzeyi ile protein ekspresyonu arasında tam bir paralellik gözlemlenmemiştir. Özellikle bazı gruplarda mRNA düzeyinde anlamlı bir artış tespit edilirken, aynı gruplarda protein düzeyinde beklenen doğrultuda bir artış izlenmemiştir. Bu durum, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel regülasyon mekanizmalarının SIRT1 ve SIRT2 ifadesi üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu çelişkiler, *SIRT1* ve *SIRT2*'nin hücre içi dengelenmesinin karmaşık bir şekilde düzenlendiğini ve tek başına mRNA düzeylerinin biyolojik aktiviteyi yansıtmakta yeterli olmayabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla, bu çalışma kapsamında elde edilen veriler *SIRT1*'in rolüne dair net bir

yargıya varmak için yeterli değildir ve konuya dair daha kapsamlı, ileri düzey analizlere ihtiyaç vardır.

Sulu çözeltide borik asit veya borat iyonları olarak bulunan boron bileşiklerinin fizyolojik pH'da biyolojik moleküllerle esterleşmesini araştıran çalışmalar, hem borik asit hem de boratın NAD^+ ve NADH'ye bağlandığını göstermiştir (125). Borun NAD+ ile etkileşimine dayanan bir çalışmada *SIRT3* aktivitesi araştırılmıştır. Borun hepatositlerde *SIRT3*'ü NAD^+-borat etkileşimi yoluyla aktive ettiği gösterilmiştir (126). Bu bilgiler bağlamında çalışmamızda boron türevlerinin lipid metabolizması üzerindeki etkilerini daha ayrıntılı bir şekilde araştırmak için NAD bağımlı *SIRT1* ve *SIRT2* gen ve protein ekspresyonlarının yanı sıra hücresel NAD ölçümleri ve boron bileşikleri ile hücre dışı ortamda SIRT1 enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır.

Çalışmamızda, CaFB'nin SIRT1 enzim aktivitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve bu bileşiğin SIRT1'i doza bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. BA uygulanan grupta SIRT1 enzim aktivitesinde azalma eğilimi gözlemlenmiş olmakla birlikte, bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuç, BA'nın SIRT1 aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığını ya da uygulanan doz ve sürenin biyolojik yanıt oluşturmak için yetersiz kaldığını düşündürmektedir. *SIRT1*, NAD^+ bağımlı bir deasetilaz olup gen ekspresyonu, enerji metabolizması, hücre yaşlanması ve stres yanıtları gibi birçok hücresel süreçte görev alır (123). *SIRT1*'in kanserdeki rolü ise karmaşıktır; bazı durumlarda tümör baskılayıcı, bazı durumlarda ise tümör destekleyici olabilir (93). Çalışmamız, doğrudan tümör hücreleriyle ilişkili olmasa da, SIRT1'in bazı kanser türlerinde proliferasyon ve hücre hayatta kalma süreçlerinde rol oynadığına dair bulgular göz önünde bulundurulduğunda, CaFB'nin SIRT1 üzerindeki potansiyel inhibe edici etkisinin antikanser araştırmalarda da değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Literatürde bor bileşiklerinin antioksidan, anti-inflamatuvar ve antiproliferatif etkileri iyi belgelenmiştir (82). Ayrıca CaFB'nin doğal fruktoz kompleksi içinde bulunması, biyoyararlanımını artırarak hücresel etkileşimleri kolaylaştırabilir. Bu bulgular doğrultusunda, CaFB'nin *SIRT1* üzerinden gerçekleştirdiği biyolojik etkilerin, özellikle onkolojik hedeflemelerde yeni stratejilere katkı sağlayabileceği değerlendirilmektedir. Hong ve arkadaşları (127) BF175'i

SIRT1 agonisti yeni bir boron bazlı bileşik olarak bildirmişlerdir. Sentez yoluyla elde edilen boron içeren küçük moleküllerden biri olan YK-3-237, üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde SIRT1 ve SIRT2 enzim aktivitesini resveratrolden daha güçlü bir şekilde aktive ederek *SIRT* aktivatör molekülü olarak tanımlanmıştır (128). Resveratrol ilk tanımlanan, en bilinen ve güçlü bir *SIRT1* aktivatörüdür (129). Fisetin, vitamin D, İndol-3-karbinol de *SIRT1*'i direkt etkileyen doğal bileşikler arasında bulunmaktadır (97, 119, 120). SRT1720 olarak tanımlanan bir madde ise resveratrolden çok daha güçlü bir aktivatör olarak literatüre geçmiştir (130). Tüm bu *SIRT1* aktivatörlerinin tip 2 diyabet, diyete bağlı obezite, non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı gibi metabolik hastalıklara karşı koruyucu bir rolü olduğu vurgulanmaktadır (131). *SIRT1*'in *p53*'ü deasetile ettiği ve p53 tümör baskılama aktivitesini inhibe ederek onkogen olarak işlev gördüğü bildirilmiştir. Fakat *SIRT1*'in tümör baskılayıcı olarak işlev görebileceğini öne süren çalışmalar da mevcuttur. *SIRT1-p53* eksenini etkisiz hale getiren tümörlerin çoğunda *p53*'teki mutasyonlar mevcuttur; dolayısıyla *SIRT1*'in spesifik tümörün genetik profiline bağlı olarak hem tümör baskılayıcı hem de aktivatör olarak işlev görmesi mümkün olup yeni *SIRT1* inhibitör/aktivatörlerinin keşfi önem göstermektedir (93). Çalışmamızda CaFB bileşiğinin *SIRT1* aktivitesine etkisi insan rekombinant SIRT1 kullanılarak araştırılmıştır. CaFB'nin *SIRT1*'i %42 oranda inhibe ettiği bulgusu önemli ve temel bir bilgi sunmaktadır. Bu bileşikler *SIRT1*'in biyolojisini incelemek ve *SIRT1* inhibitörlerinin terapötik kullanımlarını araştırmak için kimyasal araçlar olarak kullanılabilir. Son çalışmalar, SIRT1'in spesifik inhibitörlerle hedeflenmesinin kanser hücrelerinin hayatta kalma mekanizmalarını bozabileceğini ve bu bileşikleri onkolojide kombinasyon tedavileri için çekici adaylar haline getirdiğini vurgulamaktadır (132). Bir SIRT1 inhibitörü olan Tenovin-6, tümör baskılayıcı protein p53'ü aktive ederek akut lenfoblastik lösemi (ALL) hücrelerinin büyümesini güçlü bir şekilde baskılamıştır. Tenovin-6 tedavisi ALL hücrelerinin etoposid ve sitarabin gibi yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlara karşı duyarlılığını artırmıştır. Apoptozu indüklemiş ve hücre proliferasyonu ve kök hücre özelliği ile ilişkili Wnt/β-katenin yolunu baskılamıştır (133). Bu sonuçlar, CaFB'nin SIRT1 aktivitesinde önemli bir inhibisyona neden olduğunu göstermekte ve CaFB'nin SIRT1 yoluyla kanser tedavisinde potansiyel bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda CaFB bileşiğinin SIRT1 enzim aktivitesini doz bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durum, CaFB'nin doğrudan ya da dolaylı bir mekanizma ile SIRT1'in katalitik bölgesi veya kofaktör bağlanma alanları üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu mekanizmanın tam olarak aydınlatılması için SIRT1'in yapısal bağlanma analizleri, NAD^+ düzeylerinin daha detaylı ölçümü ve inhibitör kinetiği gibi ileri düzey moleküler çalışmalar gereklidir. Elde edilen bulgular, CaFB'nin yalnızca bir bor kaynağı olarak değil, aynı zamanda potansiyel bir SIRT1 modülatörü olabileceğini ortaya koymaktadır.

Protein düzeylerini analiz eden yöntemler, yalnızca miktarı değil aynı zamanda işlevselliği de değerlendirme açısından farklılık gösterir. ELISA, toplam protein miktarını ölçerken, enzimin aktif olup olmadığını göstermez. Buna karşılık, enzim aktivite ölçümleri proteinin biyolojik işlevini doğrudan ortaya koyar. Bu nedenle, her iki yaklaşımın birlikte kullanılması, özellikle hücresel sinyal ve metabolik süreçlerin incelendiği çalışmalarda daha kapsamlı bilgiler sağlar (134).

Çalışmamızda SIRT1 aktivite ölçümünden farklı olarak *SIRT1* ve *SIRT2* relatif gen ifadeleri PCR ile araştırılmış ve kullanılan boron bileşiklerinin adipogenezin farklı günlerinde *SIRT1* ve *SIRT2* üzerinde anlamlı artışlar gösterdiği bulunmuştur. Özellikle *PPARγ* ekspresyonunun baskılandığı dozlarda ve günlerde *SIRT1*'in ekspresyonu artışta bulunmuştur. Elde edilen bulgumuz, literatürde de bildirildiği üzere (135), SIRT1 ve SIRT2'nin PPARγ ve C/EBPα transkripsiyon faktörleri üzerinde baskılayıcı bir rol oynadığını ve bu yolla adipogenezin regülasyonuna katkı sağladığını göstermektedir.Boron bileşiklerinin bu etkiyi gösterirken doğrudan *SIRT1*'i hedef almadığını fakat bir başka yolak aracılığıyla *SIRT1*'i etkilediğini düşünmekteyiz. Doğan ve arkadaşlarının çalışmasında borik asitin wnt/b-katenin yolağı ile ilişkili olduğu yer almaktadır (103). Kalsiyum früktoborat için yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. BA'ya kıyasla CaFB bileşiğinin *SIRT1*'in daha yüksek oranda artışına sebep olduğu bulgusu ile CaFB'nin adiposit oluşumunu baskıladığı etki mekanizması ve *SIRT1*'i hangi yolak aracılığı ile etkilediği araştırılmalıdır.

Üstüner ve arkadaşları (126) sodyum borat uygulamasının hepatositlerde NAD seviyelerini artırdığını göstermiştir. SIRT3 deasetilaz aktivitesindeki artışa NAD'deki artışın aracılık ettiğini açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda, hücresel NAD

seviyelerinin 48 saat boron uygulamasından sonra değişmediği gözlenmiştir. Bu çalışmanın kısıtlılıklarından biridir ve gelecek çalışmalarda farklı zaman aralıklarında NAD ölçümleri planlanabilir.

Boron elementinin çeşitli formları metabolik süreçler üzerinde düzenleyici etkiler göstermektedir. Bu çalışmada, BA ve CaFB bileşiklerinin 3T3-L1 adiposit hücre kültüründe adipojenik farklılaşma ve lipid birikimi üzerine etkileri karşılaştırılmıştır. Bulgularımız, CaFB uygulamasının BA'ya kıyasla adipogenez sürecini anlamlı düzeyde daha güçlü şekilde inhibe ettiğini ve lipid birikimini daha fazla azalttığını ortaya koymaktadır. CaFB'nin, yapısında fruktoz içermesi nedeniyle şeker taşıyıcıları (GLUT gibi) aracılığıyla hücreye alındığı düşünülmektedir. Adiposit hücrelerde GLUT4 gibi glikoz taşıyıcılarının yüksek ekspresyon gösterdiği bilinmektedir (14, 82). Bu çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda, CaFB'nin BA'ya kıyasla daha etkili olmasının, adipositlerde daha verimli bir şekilde hücre içine alınmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bu durum, CaFB'nin hücre içinde daha yüksek konsantrasyonlara ulaşarak daha güçlü bir intraselüler etki potansiyeli oluşturmasını sağlayabilir. Ayrıca, CaFB'nin hem hücre içi (serbest borik asit formunda) hem de hücre dışı (fruktoz-borat esterleri halinde) düzeyde biyolojik olarak aktif olduğu, bu nedenle borik asit veya borata kıyasla daha karmaşık ve etkili bir etki mekanizmasına sahip olduğu bildirilmiştir. Hücresel ve moleküler düzeyde, CaFB'nin borik asit ve borata göre üstünlük gösterdiği ve inflamatuar yanıta karşı çok yönlü bir "koruyucu" etki oluşturduğu literatürde vurgulanmaktadır. Ayrıca, fruktoborat kompleksinin hidroliziyle açığa çıkan serbest borik asidin, doğrudan borik asit, boraks ya da sodyum boratın diyetle alınmasına kıyasla daha düşük toksisiteye sahip olabileceği bildirilmektedir (136). Beslenme uzmanlarının besin maddeleri içeriğinde bulunan CaFB hakkında bilgi düzeylerinin arttırılması ve kilo kontrolü takibi yaptıkları obez danışanların besin listelerine doğal yollardan boron bileşikleri alabilecekleri besinleri eklemeleri yapılan çalışmalarla bu bileşiklerin güvenilirliğinin kanıtlanması ve etkinliğinin tespit edilmesi ile mümkün olabilecektir.

Literatür bilgileri ve tez çalışmamızla da katkıda bulunduğumuz veriler ışığında; bitkisel kaynaklı ve suda çözünebilen bir boron bileşiği olan CaFB, obeziteyle ilişkili

nutrasötik formülasyonların geliştirilmesinde potansiyel bir ajan olarak umut vadetmektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, CaFB ve BA'nın lipid birikimini engelleyerek *in vitro* koşullarda obezite karşıtı potansiyel etkilerini ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, bu bileşiklerin adiposit farklılaşmasını düzenleyen *SIRT* sinyal yolakları üzerinden etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu kapsamda, borun obeziteyle mücadelede rol oynayabilecek doğal bir ajan olarak değerlendirilebileceğine dair yeni kanıtlar sunulmuştur. Çalışmamız, CaFB'nin adipogenezin düzenlenmesi üzerindeki olumlu etkisini gösteren ilk çalışma olup bu bileşiğin obeziteye karşı etkili ve güvenli tedavi seçenekleri geliştirilmesinde umut vaat ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, önerilen mekanizmanın netleştirilmesi için *SIRT* gen susturma teknolojileriyle daha ileri düzeyde *in vitro* analizler yapılması ve elde edilen verilerin doğrulanması amacıyla *in vivo* modellerde benzer çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Dünya genelinde yeni bir pandemi niteliğinde görülen obezite ile mücadele açısından insan sağlığına olan yan etkisi az, güvenilir etken maddelerin araştırılması ve güvenli ürün geliştirilmesi için moleküler mekanizmaların çok yönlü olarak araştırılması gerekmektedir. Bu araştırmalar öncelikle hücre kültürü gibi *in vitro* çalışmalar sonra *in vivo* deney hayvanı modelleri çalışmaları ile yapılmaktadır. Bu çalışmaları daha geniş kapsamlı olan ilaç geliştirme çalışmaları takip etmektedir.

Boron bileşiklerinden kalsiyum frukto borat ve borik asitin kullanıldığı tez çalışmamızda doza ve zamana bağlı olarak bu bileşiklerin adipogenez sürecine sirtuin genleri üzerinden etkisi ve adiposit regülasyonunda etken olan *PPARγ* ve *C/EBPα* ifadelenmesinin gösterilmesi incelenerek moleküler düzeyde Boron'un obezite ile mücadelede kullanılabilir olup olmadığı yönünde verilere yeni moleküler kanıtlar sunarak devam edecek çalışmalara öncülük edilmiştir.

7.KAYNAKLAR

1. Safaei M, Sundararajan EA, Driss M, Boulila W, Shapi'i A. A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity. Comput Biol Med. 2021;136:104754.
2. World Health Organization [Internet]. [Erişim tarihi 11 Ağustos 2024]. Obesity and overweight. Erişim adresi: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight
3. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. Int J Obes. 2008;32(9):1431-7.
4. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, ve ark. Dynamics of fat cell turnover in humans. Nature. 2008;453(7196):783-7.
5. Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. Int J Mol Sci. 2016;17(1):124.
6. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. Cell Metab. 2006;4(4):263-73.
7. Madsen MS, Siersbæk R, Boergesen M, Nielsen R, Mandrup S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and C/EBPα Synergistically Activate Key Metabolic Adipocyte Genes by Assisted Loading. Mol Cell Biol. 2014;34(6):939-54.
8. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. Endocr Rev. 1999;20(5):649-88.
9. Blander G, Guarente L. The Sir2 family of protein deacetylases. Annu Rev Biochem. 2004;73:417-35.
10. Yu C, Markan K, Temple KA, Deplewski D, Brady MJ, Cohen RN. The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. J Biol Chem. 2005;280(14):13600-5.
11. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, de Oliveira RM, ve ark. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-γ. Nature. 2004;429(6993):771.
12. Feng S, Reuss L, Wang Y. Potential of Natural Products in the Inhibition of Adipogenesis through Regulation of PPARγ Expression and/or Its Transcriptional Activity. Molecules. 2016;21(10):1278.
13. Nielsen FH. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. Nutrition. 2000;16(7):512-4.
14. Miljkovic D, Scorei RI, Cimpoiaşu VM, Scorei ID. Calcium Fructoborate: Plant-Based Dietary Boron for Human Nutrition. J Diet Suppl. 2009;6(3):211-26.
15. Çil EN, Soysal Y. Anti-Obesity Effects of Calcium Fructoborate by Inhibiting Adipogenesis and Increasing SIRT's Expression in 3T3-L1 Cells. Biol Trace Elem Res. 2024;1-12.
16. Farmer SR. Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. Genes Dev. 2008;22(10):1269-75.
17. Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4(9):a008417.
18. Geloen A, Roy PE, Bukowiecki LJ. Regression of white adipose tissue in diabetic rats. Am J Physiol-Endocrinol Metab. 1989;257(4):E547-53.
19. Thomou T, Tchkonia T, Kirkland JL. Cellular and Molecular Basis of Functional Differences among Fat Depots. Adipose Tissue in Health and Disease.

John Wiley & Sons, Ltd; 2010. 21-47.
20. Kirkland JL, Hollenberg CH, Kindler S, Gillon WS. Effects of age and anatomic site on preadipocyte number in rat fat depots. J Gerontol. 1994;49(1):B31-35.
21. DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. Am J Physiol. 1998;274(5):R1460-1467.
22. Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. J Lipid Res. 2007;48(6):1253-62.
23. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 2006;444(7121):860-7.
24. Esteve Ràfols M. Adipose tissue: Cell heterogeneity and functional diversity. Endocrinol Nutr Engl Ed. 2014;61(2):100-12.
25. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. Trends Endocrinol Metab. 2009;20(3):107-14.
26. Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. Eur J Cell Biol. 2013;92(6):229-36.
27. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular Regulation of Adipogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol. 2000;16(1):145-71.
28. Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M. Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ in Maintenance of the Characteristics of Mature 3T3-L1 Adipocytes. Diabetes. 2002;51(7):2045-55.
29. Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert JM, Messaddeq N, ve ark. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. Proc Natl Acad Sci. 2004;101(13):4543-7.
30. Farmer SR. Regulation of PPARγ activity during adipogenesis. Int J Obes. 2005;29(S1):S13-6.
31. Lee JE, Ge K. Transcriptional and epigenetic regulation of PPARγ expression during adipogenesis. Cell Biosci. 2014;4(1):29.
32. PubChem. PPARG - peroxisome proliferator activated receptor gamma (human) [Internet]. [Erişim tarihi06 Mayıs 2025]. Erişim adresi: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/PPARG/human
33. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPARγ2, a lipid-activated transcription factor. Cell. 1994;79(7):1147-56.
34. Himms-Hagen J, Cui J, Danforth E, Taatjes DJ, Lang SS, Waters BL, ve ark. Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats. Am J Physiol. 1994;266(4 Pt 2):R1371-1382.
35. Koutnikova H, Cock TA, Watanabe M, Houten SM, Champy MF, Dierich A, ve ark. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPARγ hypomorphic mice. Proc Natl Acad Sci. 2003;100(24):14457-62.
36. PubChem. CEBPA - CCAAT enhancer binding protein alpha (human) [Internet]. [Erişim tarihi 06 Mayıs 2025]. Erişim adresi: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/CEBPA/human
37. Zuo Y, Qiang L, Farmer SR. Activation of CCAAT/Enhancer-binding Protein

(C/EBP) α Expression by C/EBPβ during Adipogenesis Requires a Peroxisome Proliferator-activated Receptor-γ-associated Repression of HDAC1 at the C/ebpα Gene Promoter. J Biol Chem. 2006;281(12):7960-7.
38. Ambele MA, Dhanraj P, Giles R, Pepper MS. Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways. Int J Mol Sci. 2020;21(12):4283.
39. PubChem. SIRT1 - sirtuin 1 (human) [Internet]. [Erişim tarihi 06 Mayıs 2025]. Erişim adresi: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/SIRT1/human
40. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1α and SIRT1. Nature. 2005;434(7029):113-8.
41. Schug TT, Li X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity. Ann Med. 2011;43(3):198-211.
42. Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, Schenk S, Sonoda N, Babendure JL, ve ark. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. Mol Cell Biol. 2009;29(5):1363-74.
43. Kosgei VJ, Coelho D, Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL. Sirt1-PPARS Cross-Talk in Complex Metabolic Diseases and Inherited Disorders of the One Carbon Metabolism. Cells. 2020;9(8):1882.
44. SIRT2 sirtuin 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [İnternet]. [Erişim tarihi 06 Mayıs 2025]. Erişim adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22933
45. Jing E, Gesta S, Ronald Kahn C. Sirt2 Regulates Adipocyte Differentiation Involving FoxO1 Acetylation/Deacetylation. Cell Metab. 2007;6(2):105-14.
46. Zhou S, Tang X, Chen HZ. Sirtuins and Insulin Resistance. Front Endocrinol. 2018;9:748.
47. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. Cell. 1974;3(2):127-33.
48. Green H, Kehinde O. Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. J Cell Physiol. 1979;101(1):169-71.
49. Novikoff AB, Novikoff PM, Rosen OM, Rubin CS. Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. J Cell Biol. 1980;87(1):180-96.
50. MacDougald OA, Lane MD. TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF GENE EXPRESSION DURING ADIPOCYTE DIFFERENTIATION. Annu Rev Biochem. 1995;64:345-73.
51. Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019;20(4):242-58.
52. Gil-Campos M, Cañete R, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. Clin Nutr. 2004;23(5):963-74.
53. Lane MD. Adipogenesis. İçinde: Lennarz WJ, Lane MD, editörler. Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition) [İnternet]. Waltham: Academic Press; 2013 [Erişim tarihi 23 Nisan 2025]. s. 52-6. Erişim adresi: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012378630200089X
54. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. Nat Rev Endocrinol. 2019;15(5):288-98.
55. WHO Consultation on Obesity (1999: Geneva S, Organization WH. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation [Internet]. World Health Organization; 2000 [Erişim tarihi 30 Nisan 2025]. Erişim adresi: https://iris.who.int/handle/10665/42330

56. Pi-Sunyer X. The Medical Risks of Obesity. Postgrad Med. 2009;121(6):21-33.
57. World Health Organization. Waist circumference and waist-hip ratio : report of a WHO expert consultation, Geneva, 2008. 2011 [Erişim tarihi 30 Nisan 2025]; Erişim adresi: https://iris.who.int/handle/10665/44583
58. Meldrum DR, Morris MA, Gambone JC. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions—but do we have the will? Fertil Steril. 2017;107(4):833-9.
59. World Health Organization. WHO European Regional Obesity Report 2022,. Geneva; 2022.
60. Mannar V, Micha R, Allemandi L, Afshin A, Baker P, Battersby J, ve ark. 2020 Global nutrition report: action on equity to end malnutrition [Internet]. 2020 [Erişim tarihi 15 Nisan 2025]. Erişim adresi: https://globalnutritionreport.org/reports/2020-global-nutrition-report/
61. Khalilpourfarshbafi M, Gholami K, Murugan DD, Abdul Sattar MZ, Abdullah NA. Differential effects of dietary flavonoids on adipogenesis. Eur J Nutr. 2019;58(1):5-25.
62. Küpers LK, Monnereau C, Sharp GC, Yousefi P, Salas LA, Ghantous A, ve ark. Meta-analysis of epigenome-wide association studies in neonates reveals widespread differential DNA methylation associated with birthweight. Nat Commun. 2019;10(1):1893.
63. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006;444(7122):1027-31.
64. Horwitz A, Birk R. Adipose Tissue Hyperplasia and Hypertrophy in Common and Syndromic Obesity—The Case of BBS Obesity. Nutrients. 2023;15(15):3445.
65. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(12):885-96.
66. Hardie DG. AMPK—Sensing Energy while Talking to Other Signaling Pathways. Cell Metab. 2014;20(6):939-52.
67. Laplante M, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. Cell. 2012;149(2):274-93.
68. Solinas G, Karin M. JNK1 and IKKbeta: molecular links between obesity and metabolic dysfunction. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2010;24(8):2596-611.
69. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-κB, Inflammation, and Metabolic Disease. Cell Metab. 2011;13(1):11-22.
70. Myers MG, Cowley MA, Münzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. Annu Rev Physiol. 2008;70:537-56.
71. Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, Gavrilova O, Malek R, Chen W, ve ark. Protection from Obesity and Diabetes by Blockade of TGF-β/Smad3 Signaling. Cell Metab. 2011;14(1):67-79.
72. Rezervler [İnternet]. [Erişim tarihi 08 Mayıs 2025]. Erişim adresi: https://boren.tenmak.gov.tr/tr/calisma-alanlari/rezervler.html
73. Nielsen FH, Eckhert CD. Boron. Adv Nutr. 2020;11(2):461-2.
74. Kabu M, Akosman MS. Biological Effects of Boron. İçinde: Whitacre DM, editör. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology [İnternet]. New York, NY: Springer New York; 2013 [a.yer 16 Nisan 2025]. s. 57-75. (Reviews of

Environmental Contamination and Toxicology; c. 225). Erişim adresi: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-6470-9_2
75. Hunt CD. Dietary boron: Progress in establishing essential roles in human physiology. J Trace Elem Med Biol. 2012;26(2-3):157-60.
76. Reyima ABULIMITI MK. DAILY AMOUNT OF BORON REQUIRED FOR A SUSTAINABLE HEALTHY LIFE. İçinde: BORON AND HUMAN HEALTH. Ankara: nobel; 2020.
77. World Health Organization. Boron Environmental health ctitcria. İçinde: Trace elements in human nutrition and health. Geneva-Switzerland: World Health Organization; 1998. s. 201.
78. Kuru R, Mutlu EK, Cempel E, Celik SB, Yarat A. Evaluation of Dietary Boron in terms of Health: A Retrospective Study. Clin Exp Health Sci. 2018;(8):296-300.
79. Prejac J, Skalny AA, Grabeklis AR, Uzun S, Mimica N, Momčilović B. Assessing the boron nutritional status by analyzing its cummulative frequency distribution in the hair and whole blood. J Trace Elem Med Biol. 2018;45:50-6.
80. Korkmaz M, Sayli U, Sayli BS, Bakirdere S, Titretir S, Yavuz Ataman O, ve ark. Estimation of human daily boron exposure in a boron-rich area. Br J Nutr. 2007;98(3):571-5.
81. Hunt CD, Meacham SL. Aluminum, boron, calcium, copper, iron, magnesium, manganese, molybdenum, phosphorus, potassium, sodium, and zinc: concentrations in common western foods and estimated daily intakes by infants; toddlers; and male and female adolescents, adults, and seniors in the United States. J Am Diet Assoc. 2001;101(9):1058-60.
82. Scorei RI, Rotaru P. Calcium Fructoborate—Potential Anti-inflammatory Agent. Biol Trace Elem Res. 2011;143(3):1223-38.
83. EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck D, Castenmiller J, De Henauw S, Hirsch-Ernst KI, Kearney J, vd. Safety of calcium fructoborate as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. EFSA J [Internet]. Temmuz 2021 [a.yer 15 Ağustos 2024];19(7). Erişim adresi: https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2021.6661
84. Hunter JM, Nemzer BV, Rangavajla N, Biţă A, Rogoveanu OC, Neamţu J, ve ark. The Fructoborates: Part of a Family of Naturally Occurring Sugar–Borate Complexes—Biochemistry, Physiology, and Impact on Human Health: a Review. Biol Trace Elem Res. 2019;188(1):11-25.
85. Nielsen FH. Update on human health effects of boron. J Trace Elem Med Biol. 2014;28(4):383-7.
86. PubChem. Boric Acid [Internet]. [Erişim tarihi 23 Eylül 2024]. Erişim adresi: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7628
87. Kuru R, Yilmaz S, Balan G, Tuzuner BA, Tasli PN, Akyuz S, ve ark. Boron-rich diet may regulate blood lipid profile and prevent obesity: A non-drug and self-controlled clinical trial. J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS. 2019;54:191-8.
88. Kucukkurt I, Akbel E, Karabag F, Ince S. The effects of dietary boron compounds in supplemented diet on hormonal activity and some biochemical parameters in rats. Toxicol Ind Health. 2015;31(3):255-60.
89. Aysan E, Sahin F, Telci D, Erdem M, Muslumanoglu M, Yardımcı E, ve ark. Mechanism of Body Weight Reducing Effect of Oral Boric Acid Intake. Int J

Endocrinol. 2013;2013(1):914651.
90. Das BC, Nandwana NK, Das S, Nandwana V, Shareef MA, Das Y, ve ark. Boron Chemicals in Drug Discovery and Development: Synthesis and Medicinal Perspective. Molecules. 2022;27(9):2615.
91. Rajman L, Chwalek K, Sinclair DA. Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. Cell Metab. 2018;27(3):529-47.
92. Yoshino J, Baur JA, Imai S ichiro. NAD+ Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. Cell Metab. 2018;27(3):513-28.
93. Lee JT, Gu W. SIRT1. Genes Cancer. 2013;4(3-4):112-7.
94. Dell'Omo G, Crescenti D, Vantaggiato C, Parravicini C, Borroni AP, Rizzi N, ve ark. Inhibition of SIRT1 deacetylase and p53 activation uncouples the anti-inflammatory and chemopreventive actions of NSAIDs. Br J Cancer. 2019;120(5):537-46.
95. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2010;5(1):253-95.
96. Imai S ichiro, Guarente L. NAD+ and sirtuins in aging and disease. Trends Cell Biol. 2014;24(8):464-71.
97. Chang E, Kim Y. Vitamin D decreases adipocyte lipid storage and increases NAD-SIRT1 pathway in 3T3-L1 adipocytes. Nutr Burbank Los Angel Cty Calif. 2016;32(6):702-8.
98. Pacholec M, Bleasdale JE, Chrunyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, ve ark. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and Resveratrol Are Not Direct Activators of SIRT1. J Biol Chem. 2010;285(11):8340-51.
99. Kongthitilerd P, Suantawee T, Cheng H, Thilavech T, Marnpae M, Adisakwattana S. Anthocyanin-Enriched Riceberry Rice Extract Inhibits Cell Proliferation and Adipogenesis in 3T3-L1 Preadipocytes by Downregulating Adipogenic Transcription Factors and Their Targeting Genes. Nutrients. 17 Ağustos 2020;12(8):2480.
100. Melo RCN, D'Ávila H, Bozza PT, Weller PF. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2011;689:149-61.
101. Lillie RD, Ashburn LL. Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique. Arch Pathol. 1943;36:432-40.
101. Kraus NA, Ehebauer F, Zapp B, Rudolphi B, Kraus BJ, Kraus D. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. Adipocyte. 2016;5(4):351-8.
102. Doğan A, Demirci S, Apdik H, Bayrak OF, Gulluoglu S, Tuysuz EC, ve ark. A new hope for obesity management: Boron inhibits adipogenesis in progenitor cells through the Wnt/β-catenin pathway. Metabolism. 2017;69:130-42.
103. Scorei R, Ciubar R, Ciofrangeanu CM, Mitran V, Cimpean A, Iordachescu D. Comparative Effects of Boric Acid and Calcium Fructoborate on Breast Cancer Cells. Biol Trace Elem Res. 2008;122(3):197-205.
104. Apdik H, Doğan A, Demirci S, Aydın S, Şahin F. Dose-dependent Effect of Boric Acid on Myogenic Differentiation of Human Adipose-derived Stem Cells (hADSCs). Biol Trace Elem Res. 2015;165(2):123-30.
105. Kisacam MA, Kocamuftuoglu GO, Ozan IE, Yaman M, Ozan ST. Calcium Fructoborate Prevents Skin Cancer Development in Balb-c Mice. Biol Trace Elem Res. 2020;196(1):131-44.

106. Miljkovic D. Boron carbohydrate complexes and uses thereof. US Pat. 5962049A [İnternet]. US5962049A, 1999 [Erişim tarihi 28 Mart 2024]. Erişim adresi: https://patents.google.com/patent/US5962049A/en
107. Kisacam MA, Ambarcioglu P, Yakan A. Calcium fructoborate regulate colon cancer (Caco-2) cytotoxicity through modulation of apoptosis. J Biochem Mol Toxicol. 2022;36(5):e23021.
108. Senol-Cosar O, Flach RJR, DiStefano M, Chawla A, Nicoloro S, Straubhaar J, ve ark. Tenomodulin promotes human adipocyte differentiation and beneficial visceral adipose tissue expansion. Nat Commun. 2016;7:10686.
109. Erkekoğlu P, Baydar T. Güncel İn Vitro Sitotoksisite Testleri. Hacet Univ J Fac Pharm. 2021;41(1):45-63.
111. Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A Combined Assay of Cell Viability and in Vitro Cytotoxicity with a Highly Water-Soluble Tetrazolium Salt, Neutral Red and Crystal Violet. Biol Pharm Bull. 1996;19(11):1518-20.
111. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101-8.
113. Üstüner B, ÇiMen H. Sodium borate treatment induces metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma through SIRT3 activation. Turk J Biol. 2016;40:906-14.
113. Aysan E, Sahin F, Telci D, Yalvac ME, Emre SH, Karaca C, ve ark. Body Weight Reducing Effect of Oral Boric Acid Intake. Int J Med Sci. 2011;8(8):653-8.
114. Koldemir Gündüz M. BGM, a Newly Synthesised Boron Compound, Induces Apoptosis and Reduces Oxidative Stress by Inhibiting Lipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes via PPARγ and CTRP3. Biol Trace Elem Res. 2022;200(11):4807-16.
115. Yilmaz AB, Tapsin S, Elbasan EB, Kayhan HD, Sahin F, Turkel N. Suppressor Effects of Sodium Pentaborate Pentahydrate and Pluronic F68 on Adipogenic Differentiation and Fat Accumulation. Biol Trace Elem Res. 2020;193(2):390-9.
116. Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The Biochemistry of Sirtuins. Annu Rev Biochem. 2006;75(Volume 75, 2006):435-65.
117. Bäckesjö CM, Li Y, Lindgren U, Haldosén LA. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res. 2006;21(7):993-1002.
118. Mayoral R, Osborn O, McNelis J, Johnson AM, Oh DY, Izquierdo CL, ve ark. Adipocyte SIRT1 knockout promotes PPARγ activity, adipogenesis and insulin sensitivity in chronic-HFD and obesity. Mol Metab. 2015;4(5):378-91.
119. Jin T, Kim OY, Shin MJ, Choi EY, Lee SS, Han YS, ve ark. Fisetin Up-regulates the Expression of Adiponectin in 3T3-L1 Adipocytes via the Activation of Silent Mating Type Information Regulation 2 Homologue 1 (SIRT1)-Deacetylase and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs). J Agric Food Chem. 2014;62(43):10468-74.
120. Choi Y, Um SJ, Park T. Indole-3-carbinol directly targets SIRT1 to inhibit adipocyte differentiation. Int J Obes. 2013;37(6):881-4.
121. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. FEBS Lett. 2009;583(24):3966-73.
122. Leibiger IB, Berggren PO. Sirt1: a metabolic master switch that modulates lifespan. Nat Med. 2006;12(1):34-6; discussion 36.

123. Quinn PG, Yeagley D. Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. Curr Drug Targets Immune Endocr Metab Disord. 2005;5(4):423-37.
125. Kim DH, Marbois BN, Faull KF, Eckhert CD. Esterification of borate with NAD+ and NADH as studied by electrospray ionization mass spectrometry and 11B NMR spectroscopy. J Mass Spectrom. 2003;38(6):632-40.
125. Üstüner B, Çimen H. Sodium borate treatment induces metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma through SIRT3 activation. Turk J Biol. 2016;40(4):906-14.
126. Hong Q, Zhang L, Das B, Li Z, Liu B, Cai G, ve ark. Increased podocyte Sirtuin-1 function attenuates diabetic kidney injury. Kidney Int. 2018;93(6):1330-43.
128. Yi YW, Kang HJ, Kim HJ, Kong Y, Brown ML, Bae I. Targeting mutant p53 by a SIRT1 activator YK-3-237 inhibits the proliferation of triple-negative breast cancer cells. Oncotarget. Temmuz 2013;4(7):984-94.
129. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, vd. Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature. 11 Eylül 2003;425(6954):191-6.
130. Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, vd. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. Cell Metab. Kasım 2008;8(5):347-58.
131. Chaudhary N, Pfluger PT. Metabolic benefits from Sirt1 and Sirt1 activators. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. Temmuz 2009;12(4):431-7.
132. Bursch KL, Goetz CJ, Smith BC. Current Trends in Sirtuin Activator and Inhibitor Development. Molecules. 06 Mart 2024;29(5):1185.
133. Jin Y, Cao Q, Chen C, Du X, Jin B, Pan J. Tenovin-6-mediated inhibition of SIRT1/2 induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells and eliminates ALL stem/progenitor cells. BMC Cancer. 07 Nisan 2015;15:226.
134. Prabakaran S, Lippens G, Steen H, Gunawardena J. Post-translational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. WIREs Syst Biol Med. Kasım 2012;4(6):565-83.
135. Jakab J, Miškić B, Mikšić Š, Juranić B, Ćosić V, Schwarz D, vd. Adipogenesis as a Potential Anti-Obesity Target: A Review of Pharmacological Treatment and Natural Products. Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther. 2021;14:67-83.
136. Mogoşanu GD, Biţă A, Bejenaru LE, Bejenaru C, Croitoru O, Rău G, vd. Calcium Fructoborate for Bone and Cardiovascular Health. Biol Trace Elem Res. 2016;172:277-81.

8.EKLER

EK 1: ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Doç.Dr.Yasemin SOYSAL

Araştırmanızın ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4115-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☒	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Bor'un Sirtuin'ler Üzerindeki Potansiyel Etkisi ile Progenitör Hücrelerde Adipogenezin Moleküler Regülasyonu**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Yasemin SOYSAL Sağlık Bilimleri Ens. Moleküler Tıp A.D	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2018/16-36**	**Tarih:28.06.2018**
	Doç.Dr.Yasemin SOYSAL'ın sorumlusu olduğu **"Bor'un Sirtuin'ler Üzerindeki Potansiyel Etkisi ile Progenitör Hücrelerde Adipogenezin Moleküler Regülasyonu"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Ali Riza ŞİŞMAN (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KİRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☒	H ☐	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

Doç.Dr.Yasemin SOYSAL çalışmada yardımcı araştırmacı olduğu için çalışma görüşülürken toplantıda bulunmamıştır.

EK 2: ETİK KURUL SÜRE UZATMA KARARI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Doç.Dr.Yasemin SOYSAL

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**
AÇIK ADRES	**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR**
TELEFON	**0 232 412 22 54-0 232 412 22 58**
FAKS	**0 232 412 22 43**
E-POSTA	**etikkurul@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	4115-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☐ DOKTORA ☒	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Bor'un Sirtuin'ler Üzerindeki Potansiyel Etkisi ile Progenitör Hücrelerde Adipogenezin Moleküler Regülasyonu**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Yasemin SOYSAL Sağlık Bilimleri Ens. Moleküler Tıp A.D	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ☐

	Belge Adı	**Tarihi**	**Versiyon Numarası**	**Dili**
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2021/02-71	Tarih:18.01.2021
	Doç.Dr.Yasemin SOYSAL'ın sorumlusu olduğu **"Bor'un Sirtuin'ler Üzerindeki Potansiyel Etkisi ile Progenitör Hücrelerde Adipogenezin Moleküler Regülasyonu"** isimli klinik araştırmaya ait araştırmacı dilekçesine ilişkin; Çalışma süresinin 36 ay süre ile uzatılması ile ilgili belgeler incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL (Başkan Yardımcısı)	Tıbbi Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

KATKI

Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2022-2810 ve TÜBİTAK tarafından 222S104 ve 124S255 proje numarası ile desteklenmiştir.

EK 3: ÖZGEÇMİŞ



EZGİ NUR ÇİL

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

15 Şubat 2018 - Şu Anda (7 yıl 3 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (BÜTÜNLEŞİK DR)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.48 / 4.0

02 Eylül 2013 - 07 Haziran 2017 (3 yıl 10 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
AYDIN SAĞLIK YÜKSEKOKULU, BESLENME VE DİYETETİK PR.
Diploma Numarası: 2017/4354-9383
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.12 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Beslenme ve Diyetetik

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Tıbbi Biyoloji

Anahtar Kelimeler

Bor Mineralleri

Obezite

3T3-L1 Preadiposit Hücre Serisi

Ar-Ge Yetkinlik

Kitaplar

Y. SOYSAL & E. N. ÇİL, Epigenetik ve Beslenme, E. YURTCU [Editörler], EPİGENETİK(317 - 349), ISBN: 978-625-5600-15-8, TÜRKİYE: Palme Yayınevi, 10 Nisan 2025, Kitapta Bölüm.

Makaleler

E. N. ÇİL & Y. SOYSAL, Obezite Araştırmaları İçin İn Vitro Adiposit Hücre Kültürü İle Etkili Model Oluşturma: Ön Çalışma, Turkish Journal of Diabetes and Obesity, 2024, 2587-0335, 8, 1, 59-64.

E. N. CIL & Y. SOYSAL, Anti-Obesity Effects of Calcium Fructoborate by Inhibiting Adipogenesis and Increasing SIRT's Expression in 3T3-L1 Cells, BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH, 2024, 0163-4984, 12.

E. N. ÇİL & Y. SOYSAL, Bor Elementi ve Biyolojik Sistemlere Etkisi, Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi, 2021, 2630-5585, 4, 2, 57-65.

E. N. ÇİL & Y. SOYSAL, Molecular and Therapeutic Effects of Fisetin Flavonoid in Diseases, Journal of Basic and Clinical Health Sciences, 2020, 2458-8938, 4, 3, 190-196.

Bildiriler

E. N. ÇİL & Y. SOYSAL, Calcium Fructoborate: A Novel Natural Compound That Inhibits SIRT1 Activity, Poster Sunumu, X.International Congress of Molecular Medicine, 23 Ekim 2024, 27 Ekim 2024.

E. N. ÇİL & Y. SOYSAL, Comparison of the Cytotoxic Effects of Calcium Fructoborate and Boric Acid as Boron Compounds, Poster Sunumu, X.International Congress of Molecular Medicine, 23 Ekim 2024, 27 Ekim 2024.

E. N. ÇİL & Y. SOYSAL, ADİPOSİT HÜCRELERİYLE İLGİLİ OBEZİTE ARAŞTIRMALARINDA ETKİLİ BİR MODEL OLUŞTURMANIN ZORLUKLARI, Tam Metin Bildiri, 2. Uluslararası Spor ve Sağlık Araştırmaları Kongresi, 21 Kasım 2023, 22 Kasım 2023.

E. N. ÇİL & Y. SOYSAL, EXPERIENCES WITH ADIPOCYTE CELL CULTURE AND EFFECTS OF BORON, Tam Metin Bildiri, DEU INTERNATIONAL SYMPOSIUM SERIES ON GRADUATE RESEARCHES-2023, 09 Kasım 2023, 10 Kasım 2023.

E. N. ÇİL & Y. SOYSAL, Immunonutritional Therapy in COVID-19 Pandemia, Sözlü Sunum, COVID-19 Pandemisinde Araştırma-Yayın ve Eğitim Süreçlerine Bakış 14 Kongresi, 15-16 Ocak 2021, 15 Ocak 2021, 16 Ocak 2021, 2564-7288, 5, S1, 1 - 203.

E. N. ÇİL, N. DEMİRKIRAN & Y. SOYSAL, FISETIN AND CANCER, Sözlü Sunum, 2. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi, 18 Ekim 2019, 19 Ekim 2019.

E. N. ÇİL, N. DEMİRKIRAN & Y. SOYSAL, FISETIN AND CANCER, Tam Metin Bildiri, 2. Uluslararası Tarım, Çevre ve Sağlık Kongresi, 18 Ekim 2019, 19 Ekim 2019.

E. N. ÇİL, N. DEMİRKIRAN & L. ELMAS, Thymoquinone: As A Potential Anti-Cancer Agent, Poster Sunumu, CELL DEATH: DEGENERATION AND REGENERATION, 03 Ekim 2019, 05 Ekim 2019.

Projeler

BAP, ARAŞTIRMACI, Borun Sirtuinler üzerindeki potansiyel etkisi ile progenitör hücrelerde adipogenezin moleküler regülasyonu, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TEMEL ARAŞTIRMA, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, Adiposit Hücrelerde Bor Bileşiklerinin Sirtüin Genlere Ve Adipogeneze Etkisi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) , 01 Mayıs 2024, 01 Kasım 2024.

ARAŞTIRMA PROJESİ, PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, Preadiposit Hücre Hattında Borik Asit ve Kalsiyum Früktoborat Bileşiklerinin Sirtüinler Üzerinden Adipojenik Genlere Etkilerinin Araştırılması, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Yurt İçi) , 01 Kasım 2022, 01 Ocak 2024.

Yayılımlar

Bilimsel Bir Makale Nasıl Yazılır ve Yayımlanır Eğitimi, EĞİTİM/KURS VERİLMESİ, Ulusal, 27 Aralık 2022 - 28 Aralık 2022.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

124S255, Adiposit Hücrelerde Bor Bileşiklerinin Sirtüin Genlere Ve Adipogeneze Etkisi, Yürütücü, Sonuçlandı, SBAG - Sağlik Bi?li?mleri? Araştirma Destek Grubu, 1002 - Hızlı Destek / Hızlı Destek - B, ARDEB, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.05.2024 - (), Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.05.2024 - 01.11.2024.

222S104, Preadiposit Hücre Hattında Borik Asit ve Kalsiyum Früktoborat Bileşiklerinin Sirtüinler Üzerinden Adipojenik Genlere Etkilerinin Araştırılması, Yürütücü, Sonuçlandı, SBAG - Sağlik Bi?li?mleri? Araştirma Destek Grubu, 1002 - Hızlı Destek / Hızlı Destek - A, ARDEB, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.11.2022 - (), Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.11.2022 - 01.01.2024.

BİDEB Destekleri

EZGİ NUR ÇİL, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, Destek Sona Erdi, 2023 - 1.

EZGİ NUR ÇİL, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, BİÇABA-Birlikte Çalışıp Birlikte Başaracağız Burs Programı-Proje Yürütücüsü Bilgi Girişi, Desteklenmesine Karar Verildi, 2023 - 1.

EZGİ NUR ÇİL, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, Destek Sona Erdi, 2023 - 2.

EZGİ NUR ÇİL, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, Destek Sona Erdi, 2024 - 1.

EZGİ NUR ÇİL, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, Destek Sona Erdi, 2024 - 2.

EZGİ NUR ÇİL, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, Destekleniyor, 2020 - 2, 01.10.2020 - 30.06.2025.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM	UİDB	TEYDEB	Toplam
Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Moderatorlük Sayısı	0	0	0	0	0	0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0
Raportörlük Sayısı	0	0	0	0	0	0