T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KURKUMİN'İN, 3T3-L1 HÜCRELERİNDE PERFLORODEKANOİK ASİT (PFDA) TARAFINDAN İNDÜKLENEN ADİPOGENEZ SÜRECİ ÜZERİNE ETKİSİ

AYTEN DARCAN

ORCID: 0009-0007-1565-1315

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

Moleküler Tıp Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

AĞUSTOS 2025

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2022970047

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KURKUMİN'İN, 3T3-L1 HÜCRELERİNDE PERFLORODEKANOİK ASİT (PFDA) TARAFINDAN İNDÜKLENEN ADİPOGENEZ SÜRECİ ÜZERİNE ETKİSİ

AYTEN DARCAN
ORCID: 0009-0007-1565-1315

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
Moleküler Tıp Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yasemin SOYSAL
ORCID: 0000-0003-1580-0564

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2024-3460 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR
AĞUSTOS 2025

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum "**Kurkumin'in, 3T3-L1 Hücrelerinde Perflorodekanoik Asit (PFDA) Tarafından İndüklenen Adipogenez Süreci Üzerine Etkisi**" başlıklı Yüksek Lisans 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.

Ayten DARCAN

22.07.2025

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve desteğini hiç esirgemeyen, sadece akademik anlamda değil, insani yönüyle de bana ilham veren kıymetli danışmanım Sayın Doç. Dr. Yasemin Soysal'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamın yürütülmesinde alt yapı ve ekipmanları kullanmama müsaade eden Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'na ve ARLAB ekibine,

Laboratuvar deneyimi ve yol göstericiliğiyle yardımını hiç esirgemeyen Dr. Ezgi Nur Çil'e, her sorumu sabırla cevaplayan ve birçok uygulamada yardım edip yol gösteren Dr. Zehra Tavşan'a, bu süreçte sağlık sorunum nedeniyle laboratuvara gidemediğimde sabırla çalışmamı devam ettiren arkadaşım Zeynep Aleyna Şahin'e, zorlu laboratuvar günlerini kolaylaştıran, beraber gülüp eğlendiğimiz arkadaşlarım Ülkü Balandız, Ezgi Selçuk ve Kübra Eren'e, yalnızca akademik anlamda değil, insani olarak da yanımda olduğunu hissettirdiği için hayatımdaki bu değerli insanlara ve yolumuzun kesişmesine sebep olan yüksek lisans sürecime de teşekkür ederim.

Projeyi maddi yönden destekleyen DEÜ-BAP birimine teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İzmir'deki kuzenlerim Gizem Erkuş ve Efehan Erkuş'a, beni teyzesi olarak gören Nehir Erkuş'a, son altı ayımda edindiğim güzel yurt arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu süreçte her daim yanımda olan, yalnızca kardeşim olarak değil aynı zamanda en büyük manevi ve psikolojik destekçim canım kardeşim Cengiz Berk Darcan'a, zorlandığım her an beni cesaretlendiren, umutsuzluğa kapıldığımda tek cümlesiyle yeniden motive eden, bu yolculuğu benim için daha katlanılır kılan idolüm canım annem Cevriye Darcan'a, beni koşulsuzca seven, her zaman inanan, düşsem kaldıran, yorulsam omuz olan çınarım canım babam Ali Nazmi Darcan'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum. Varlığınız, gücümün en büyük kaynağı oldu. Hem maddi hem de manevi desteğinizle bugünlere gelmemde en büyük pay sizindir. "Yaparsın, sen halledersin" dediğiniz her an, gerçekten de yaptım. Tezimi hazırlarken her bir gözyaşımı sabırla sildiğiniz için teşekkür ederim ve bu emeğe, bu sevgiye sadece 'teşekkür ederim' demek yetmediği için tezimi beni sevgi dolu yetiştiren canım aileme ithaf ediyorum.

Ayten DARCAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TABLOLAR DİZİNİ i
ŞEKİLLER DİZİNİ ii
SİMGELER VE KISALTMALAR iv
ÖZET vi
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 4
2.1 Obezite ve Adipogenez 4
2.1.1 Obezite 4
2.1.2 Adipogenez 4
2.2 Yağ Dokusu ve Murin Yağ Hücreleri 6
2.3 Preadiposit 3T3-L1 Hücre Hattı 7
2.4 *PPARγ, C/EBPα, SREBF1* ve *FASN*'in Adipogenez ile İlişkisi 7
2.5 Kurkuminin ve Adipogenez 10
2.5.1 AMPK Aktivasyonu 11
2.5.2 Wnt/β-Katenin Sinyal Yolağı Aktivasyonu 12
2.6 PFDA ve Adipogenez 13
3. GEREÇ VE YÖNTEM 16
3.1 Araştırmanın Tipi 16
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı 16
3.3 Çalışma Materyali 17
3.4 Araştırmanın Değişkenleri 17
3.5 Veri Toplama Araçları 17
3.5.1 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar 17

3.5.2 Kullanılan Metotlar 22
3.5.2.1 Hücre Kültürü 22
3.5.2.2 Hücre Pasajlama ve Dondurma 23
3.5.2.3 Diferensiyasyon (Farklılaştırma) Protokolü 23
3.5.2.4 Kurkumin ve PFDA Stok Çözeltilerinin Hazırlanması 25
3.5.2.5 Sitotoksisite (WST-1) Testi 25
3.5.2.6 Deney Grupları 26
3.5.2.7 Oil Red-O Boyama 27
3.5.2.8 RNA İzolasyonu 28
3.5.2.9 cDNA Sentezi 31
3.5.2.10 RT-qPCR ile Gen Ekspresyon Analizi 32
3.6 Araştırma Planı 33
3.7 Verilerin Değerlendirilmesi 34
3.8 Araştırmanın Sınırlılıkları 34
3.9 Etik Kurul Onayı 34
4. BULGULAR 35
4.1 Kurkumin ve PFDA'nın Sitotoksisite Testi Bulguları 35
4.1.1 Kurkuminin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 ile Belirlenmesi 35
4.1.2 PFDA'nın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 ile Belirlenmesi 37
4.1.3 Kurkumin ve PFDA Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 ile Belirlenmesi 39
4.2 IC_{50} Değeri 41
4.3 Hücrelere Uygulanan Kurkumin ve PFDA Kombinasyonun Kombinasyon İndeks (CI) Değerlerinin Belirlenmesi 41
4.4 Oil Red-O Boyama 43
4.4.1 Kurkumin'in Hücre İçi Lipit Birikimine Etkisinin Belirlenmesi 43
4.4.2 PFDA'nın Hücre İçi Lipit Birikimine Etkisinin Belirlenmesi 46
4.4.3 Kurkumin ve PFDA'nın Hücre İçi Lipit Birikimine Etkisinin

Belirlenmesi 48
4.5 RNA İzolasyonu 50
4.6 RT-qPCR ile Gen Ekspresyon Analizi 50
5. TARTIŞMA 59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 67
7. KAYNAKLAR 68
8. EKLER 73
EK 1: Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul Onayı 73
EK 2: Katkı 75
EK 3: Özgeçmiş 76

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1: Araştırma Planı 16
Tablo 2: Proje kapsamında kullanılan kimyasal malzeme ve sarfların listesi..... 17
Tablo 3: Tez çalışmasında kullanılan cihazlara ait bilgiler..... 20
Tablo 4: 3T3-L1 preadipositlerin adipojenik farklılaşma prosedürü 24
Tablo 5: Deney grupları için seçilen dozlar 27
Tablo 6: Oil Red-O Boyama uygulama basamakları 28
Tablo 7: cDNA için hazırlanan karışım 31
Tablo 8: cDNA sentezi için dereceler ve süreler..... 31
Tablo 9: RT-qPCR için primer diziler 32
Tablo 10: RT-qPCR için hazırlanan karışım..... 32
Tablo 11: Kurkuminin konsantrasyonlara göre canlılık yüzdeliği..... 35
Tablo 12: PFDA'nın konsantrasyonlara göre canlılık yüzdeliği..... 37
Tablo 13: Kurkumin+PFDA'nın konsantrasyonlara göre canlılık yüzdeliği..... 39
Tablo 14: 3T3-L1 adiposit hücresi için uygulanan maddelerin IC50 değerleri .. 41
Tablo 15: Deney grupları için seçilen dozlar ve % canlılık oranları..... 42
Tablo 16: Kurkumin ve PFDA kombinasyonunun uygulandığı 3T3-L1 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri..... 42
Tablo 17: Boyama sonrası spektrofotometrik ölçüm sonuçları (Kurkumin) 45
Tablo 18: Boyama sonrası spektrofotometrik ölçüm sonuçları (PFDA)..... 47
Tablo 19: Boyama sonrası spektrofotometrik ölçüm sonuçları (Kombinasyon) 49
Tablo 20: Örneklere ait mRNA miktarları 50
Tablo 21: 3T3-L1 örneklerine ait *PPARγ* gen ekspresyon düzeyleri 51
Tablo 22: PPARγ geninde PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması 52
Tablo 23: 3T3-L1 örneklerine ait *C/EBPα* gen ekspresyon düzeyleri 53
Tablo 24: *C/EBPα* geninde PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması 54
Tablo 25: 3T3-L1 örneklerine ait *SREBF1* gen ekspresyon düzeyleri..... 55
Tablo 26: *SREBF1* geninde PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması 56
Tablo 27: 3T3-L1 örneklerine ait *FASN* gen ekspresyon düzeyleri..... 57
Tablo 28: *FASN* geninde PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması 58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1: Adipogenez süreci ve mekanizması 6
Şekil 2: Antiadipojenik moleküler mekanizmalar 10
Şekil 3: Kurkuminin kimyasal yapısı 11
Şekil 4: Kurkuminin lipit ve enerji metabolizması üzerindeki etkisi 12
Şekil 5: Kurkumin ve adipogenez arasındaki ilişki 12
Şekil 6: Wnt/β-katenin sinyali ve adipojenik transkripsiyon faktörleri..... 13
Şekil 7: PFDA'nın kimyasal yapısı 14
Şekil 8: 3T3-L1 hücre hattında PFDA'nın potansiyel mekanizmaları 15
Şekil 9: Çalışmada uygulanan metotların akış şeması..... 22
Şekil 10: 3T3-L1 hücrelerinin adipojenik farklılaşma prosedürü..... 24
Şekil 11: Deney aşamaları 25
Şekil 12: 96 kuyulu plakada WST-1 deneyi aşamaları..... 25
Şekil 13: Boyama sonrası invert mikroskopta temsili görüntü..... 28
Şekil 14: RNA izolasyonu basamakları (A, B, C, D) 30
Şekil 15: İş-akış şeması 33
Şekil 16: Kurkumin ile 48 saat inkübe 3T3-L1 hücrelerinin ortalama absorbans grafiği 35
Şekil 17: 96 kuyulu plaka-48 saatlik kurkumin inkübasyonu sonrası ve WST-1 solüsyonu öncesi 4X görüntüleri..... 36
Şekil 18: PFDA ile 48 saat inkübe 3T3-L1 hücrelerinin ortalama absorbans grafiği 37
Şekil 19: 96 kuyulu plaka-48 saatlik PFDA inkübasyonu sonrası ve WST-1 solüsyonu öncesi 4X görüntüleri..... 38
Şekil 20: Kurkumin+PFDA kombinasyonunun konsantrasyonlara göre ortalama absorbans grafiği 39
Şekil 21: Kurkumin+PFDA kombinasyonunun 6 kuyulu plakalarda bazı konsantrasyonlardaki 48 saatlik hücre görüntüsü (4X)..... 40
Şekil 22: Kurkumin uygulaması sonrası farklılaştırmanın son günü (4X)..... 44
Şekil 23: Kurkumin uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin boyama sonrası lipit görüntüsü (20X) 45
Şekil 24: Kurkumin uygulanan hücrelerde lipit birikiminin kantitatif ölçümü ... 46

Şekil 25: PFDA uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin boyama sonrası lipit görüntüsü (20X) 46
Şekil 26: PFDA uygulanan hücrelerde lipit birikiminin kantitatif ölçümü 47
Şekil 27: Farklı dozlarda kurkumin+PFDA uygulanan hücrelerin 8. gün lipit görüntüsü (20X) 48
Şekil 28: Kurkumin+PFDA uygulanan hücrelerde lipit birikiminin kantitatif ölçümü 49
Şekil 29: Örneklerin mRNA izolasyonu ve cDNA sentezini takiben RT-qPCR analizi 50
Şekil 30: *PPARγ* relatif gen ekspresyon düzeyleri (kontrole kıyasla) 51
Şekil 31: *PPARγ* relatif gen ekspresyon düzeyleri (gruplar arası karşılaştırma) . 52
Şekil 32: *C/EBPα* relatif gen ekspresyon düzeyleri (kontrole kıyasla) 53
Şekil 33: *C/EBPα* relatif gen ekspresyon düzeyleri (gruplar arası karşılaştırma) 54
Şekil 34: *SREBF1* relatif gen ekspresyon düzeyleri (kontrole kıyasla)..... 55
Şekil 35: *SREBF1* relatif gen ekspresyon düzeyleri (gruplar arası karşılaştırma) 56
Şekil 36: *FASN* relatif gen ekspresyon düzeyleri (kontrole kıyasla)..... 57
Şekil 37: *FASN* relatif gen ekspresyon düzeyleri (gruplar arası karşılaştırma)... 58

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACC: Asetil-CoA Karboksilaz

AMPK*:* AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz

aP2: adiposit Protein 2

ATCC: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu

BBP: Benzil Bütil Ftalat

C/EBP*:* CCAAT/Güçlendirici Bağlayıcı Proteinler

C/EBPα: CCAAT/Güçlendirici Bağlayıcı Protein-alfa

cDNA: Komplementer DNA

CI: Combination Index (Kombinasyon İndeksi)

CPT1: Karnitin Palmitoiltransferaz-1

DEX: Dexamethasone

DMEM: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu

DMSO: Dimetil Sülfoksit

ELISA: Enzime Bağlı İmmünosorbent Analiz

FASN: Yağ Asidi Sentaz

FBS: Fetal Bovin Serum

GAPDH: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz

GPAT-1: Gliserol-3-Fosfat Asil Transferaz-1

GLUT4: Glukoz Taşıyıcı Protein 4

HMGCS: Hidroksimetilglutaril Koenzim A Sentaz

IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine

LPL: Lipoprotein Lipaz

MCE: Mitotik Klonal Genişleme

mRNA: Haberci RNA

NCBI: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi

NIEHS: Ulusal Çevre Sağlığı Bilimleri Enstitüsü

NLRP3: The Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat and Pyrin Domain Containing Receptor 3

ORO: Oil Red-O (Boyama)

P/S: Penisilin/Streptomisin Antibiyotik

PBS: Phosphate Buffered Saline (Fosfat tamponlu tuzlu su)

PFA: Paraformaldehit

PFAS: Per- ve Polifloroalkil Maddeler

PFC'ler: Perflorlu Bileşikler

PFDA: Perflorodekanoik Asit

PPARγ: Peroksizom Proliferatörle Aktive Olan Reseptör-gamma

RT-qPCR: Real Time-kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Tm: Melting Temperature (Erime Sıcaklığı)

SREBF1: Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 1

WST-1: Water Soluble Tetrazolium Salts (Proliferation assay)

KURKUMİN'İN, 3T3-L1 HÜCRELERİNDE PERFLORODEKANOİK ASİT (PFDA) TARAFINDAN İNDÜKLENEN ADİPOGENEZ SÜRECİ ÜZERİNE ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Ayten DARCAN

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

ÖZET

Obezite fazla vücut yağına sahip olmayı içeren, birçok hastalığın ve sağlık sorunlarının riskini artıran tıbbi bir sorundur. Yağ dokusunun büyümesi ve genişlemesi obeziteye neden olmaktadır. Adipogenez, preadipositlerin adipositlere olgunlaşması için farklılaşma süreci olarak tanımlanır. Adiposit farklılaşmasının engellenmesi adipogenez ve dolayısıyla obeziteye karşı potansiyel terapötik strateji olarak kullanılabilir. Perflorodekanoik asit (PFDA), gıda kapları ve birçok malzemede kullanılması nedeniyle canlıların maruz kaldığı endokrin bozucu özellikte olan ve adipogenez sürecini indükleyen bir plastikleştiricidir. Kurkumin ise antiadipojenik özelliğinin de olduğu bilinen, yan etkisi olması potansiyeli az bir bitkisel terapötik ajandır. 3T3-L1 hücre hattı *in vitro* adipogenez çalışmaları için sıklıkla tercih edilmektedir. Literatürde Kurkumin'in 3T3-L1 hücrelerinde adipogenez sürecini inhibe ettiği bildirilmiştir. Fakat araştırıldığı üzere henüz PFDA ile muamele edilen 3T3-L1 hücrelerine Kurkumin uygulanmasının etkileriyle ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Tez çalışmamızda doğal ürünlerden olan Kurkumin maddesinin PFDA ile indüklenen adipogenez süreci üzerine etkisi ilk kez araştırılacaktır. Çalışmamızda 3T3-L1 hücreleri öncelikle adiposit hücrelere farklılaştırılarak PFDA ve Kurkumin için WST-1 testi ile etkin dozları belirlenmiştir. Oil Red-O boyama ile lipit birikimleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. *PPARγ*, *C/EBPα, SREBF1* ve *FASN* genlerindeki mRNA ekspresyon değişimleri Real Time qPCR ile analiz edilmiştir. *PPARγ* ve *C/EBPα* adiposit farklılaşmasının bilinen düzenleyicileridir ve adipogenez sürecinde ifadeleri artmaktadır. *FASN*, yağ asidi sentezinden sorumlu enzimdir. *FASN* promotöründeki *SREBF1* tarafından fonksiyonel olarak düzenlenir. Çalışmamızda PFDA, 3T3-L1 adipositlerinde lipit birikimini ve *SREBF1*'i ve bunun hedef lipojenik gen *FASN* ekspresyonunu arttırmıştır. Kurkumin uygulamasından sonra adipogenezle ilgili genlerden olan *PPARγ*, *C/EBPα*; lipogenezle ilgili genlerden *SREBF1* ve *FASN* mRNA seviyeleri ölçülmüş ve ifadelerinde azalma tespit edilmiştir.

Çalışma bulgularımız PFDA'nın adipogenez ve lipogenezde yer alan genlerin ekspresyonunu artırdığını, ancak kurkumin uygulamasının bu artışı baskılayarak potansiyel koruyucu etki gösterebileceğini gösteren ilk çalışmadır.

Anahtar Sözcükler: adipogenez, kurkumin, obezite, perflorodekanoik asit (PFDA), 3T3-L1 hücre hattı

Tezin sayfa adedi: 92

Danışman: Doç. Dr. Yasemin SOYSAL

THE EFFECT OF CURCUMIN ON THE ADIPOGENESIS PROCESS INDUCED BY PERFLUORODECANOIC ACID (PFDA) IN 3T3-L1 CELLS

Master Thesis

Ayten DARCAN

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Department of Molecular Medicine

ABSTRACT

Obesity is a medical problem that involves having excess body fat and increases the risk of many diseases and health problems. The growth and expansion of adipose tissue causes obesity. Adipogenesis is defined as the process of differentiation of preadipocytes to mature into adipocytes. Inhibition of adipocyte differentiation can be used as a potential therapeutic strategy against adipogenesis and thus obesity. Perfluorodecanoic acid (PFDA) is a plasticiser that induces the process of adipogenesis and is an endocrine disruptor to which living organisms are exposed due to its use in food containers and many materials. Curcumin, on the other hand, is a herbal therapeutic agent known to have antiadipogenic properties and has little potential to have side effects. The 3T3-L1 cell line is frequently preferred for *in vitro* adipogenesis studies. It has been reported in the literature that curcumin inhibits the adipogenesis process in 3T3-L1 cells. However, no study has been conducted on the effects of curcumin treatment on PFDA-treated 3T3-L1 cells. In our thesis study, the effect of curcumin, a natural product, on the PFDA-induced adipogenesis process will be investigated for the first time. In our study, 3T3-L1 cells were first differentiated into adipocyte cells, and the effective doses of PFDA and curcumin were determined by the WST-1 test. Lipid accumulation was measured spectrophotometrically by Oil Red-O staining. The mRNA expression changes in *PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBF1* and *FASN* genes were analysed by Real Time qPCR. *PPARγ* and *C/EBPα* are known regulators of adipocyte differentiation and their expression increases during adipogenesis. *FASN* is the enzyme responsible for fatty acid synthesis. It is functionally regulated by *SREBF1* in the *FASN* promoter. In our study, PFDA increased lipid accumulation and *SREBF1* and its target lipogenic gene *FASN* expression in 3T3-L1 adipocytes. After curcumin administration, *PPARγ*, *C/EBPα*, one of the genes related to adipogenesis; *SREBF1* and *FASN* mRNA levels were measured and their expression decreased.

Our findings are the first study to show that PFDA increases the expression of genes involved in adipogenesis and lipogenesis. Still, curcumin administration may have a potential protective effect by suppressing this increase.

Keywords: adipogenesis, curcumin, obesity, perfluorodecanoic acid (PFDA), 3T3-L1 cell line

Page number: 92

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Yasemin SOYSAL

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Obezite, pek çok farklı etmene bağlı olarak gelişen ve küresel ölçekte ciddi sağlık problemlerine yol açan karmaşık bir sağlık sorunudur. Bu durumun temel mekanizmalarından biri olan adipogenez süreci, preadipositlerin olgun yağ hücrelerine dönüşmesiyle gerçekleşir ve bu süreçteki bozulmalar yalnızca kilo artışına değil, aynı zamanda çeşitli metabolik hastalıkların ortaya çıkmasına da neden olabilir. Adiposit farklılaşmasının baskılanması, adipogenez sürecini hedef alarak obeziteye karşı etkili olabilecek terapötik yaklaşımlar arasında değerlendirilmektedir (1). Son yıllarda yapılan çalışmalar, özellikle doğal bileşiklerin yağ hücresi farklılaşmasını ve lipit birikimini önleme potansiyeli üzerinde yoğunlaşmıştır (2). 3T3-L1 preadiposit hücre hattı, adipogenez sürecinin değerlendirilmesinde *in vitro* model olarak uzun süredir yaygın şekilde tercih edilmektedir. Son yıllarda ise bu hücre hattı, çevresel obezojenlerin taranmasına yönelik alternatif bir model sistem olarak da önerilmeye başlanmıştır (3). Ayrıca, çevresel kimyasallara maruz kalmanın, insan metabolizmasında değişimlere yol açarak bireyleri kilo almaya daha yatkın hale getirebileceği ve obezite ile ilişkili metabolik bozuklukların gelişimine neden olabileceği çeşitli bilimsel bulgularla ortaya konmuştur (4). Perflorodekanoik asit (PFDA), başta gıda ambalajları ve pişirme kapları olmak üzere, pek çok gıda uygulamasında yaygın olarak kullanılan sentetik bir kimyasaldır (5). Kurkumin, antiadipojenik özellikleri nedeniyle obezite ve ilişkili metabolik bozuklukların hafifletilmesinde potansiyel bir ajan olarak değerlendirilmektedir (6).

PPARγ, adiposit farklılaşmasının başlıca düzenleyici faktörlerinden biridir. Bu transkripsiyon faktörü, *C/EBPα* ile birlikte adipositlere özgü genlerin aktivasyonunu sağlayarak terminal farklılaşmayı teşvik eder. *PPARγ*, özellikle adipoz dokuda yüksek düzeyde eksprese edilir ve ekspresyonu, farklılaşmanın erken evrelerinde hızla artar (7). Adipogenezin bilinen diğer düzenleyicilerinden diğeri ise sterol düzenleyici element bağlayıcı transkripsiyon faktörü 1 (*SREBF1*)'dir. *SREBF1* adipogenezi indükleyen pozitif düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Adipojenik transkripsiyon faktörlerinin azaltılması, obezitenin ilerlemesi sırasında adipoz doku gelişimini engellemek için iyi bir yaklaşım olabilir. *SREBF1*, *PPARγ* aktivitesini artırarak

adipogenezi güçlendirir (2). PFDA'nın, *SREBF1* geninin ekspresyonunu artırarak adipogenez sürecini desteklediği belirlenmiştir. Yağ asidi sentezinde kilit bir rol oynayan yağ asidi sentaz (*FASN*) enzimi, transkripsiyonel olarak *SREBF1* aracılığıyla düzenlenmektedir.

3T3-L1 hücrelerinde PFDA maruziyeti sonrası kurkuminin adiposit farklılaşmasını düzenlerken *PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBF1* ve *FASN* ekspresyonunu nasıl etkilediği henüz araştırılmamıştır. Bu çalışmada öncelikle amacımız; gıdalarımızla temas edip sağlığımızı tehdit edebilecek kimyasalların obezojen etkilerini, yan etkisi bulunmayan doğal bileşiklerden birisi olan kurkumin ile en aza indirgemeyi sağlamak ve obezite ve ilişkili hastalıkların güvenli tedavisi ve önlenmesinde kullanımının etkinliğini in vitro ortamda incelemektir. Özetle, tez çalışmamızda kurkuminin antiadipojenik etkisi ile PFDA tarafından uyarılmış adipogenezin, lipit birikimi ve adipogenezle ilişkili transkripsiyon faktörü genler düzeyinde nasıl etkileneceğinin araştırılması amaçlanmıştır.

1.2. Araştırmanın Amacı

PFDA maruziyeti ile obezite arasındaki ilişkiyi ve kurkuminin bu süreçte birlikte kullanımda PFDA maruziyetindeki adipogenez ve lipogenez artışı üzerindeki etkisini adipogenezde etkili *PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBF1* ve *FASN* genlerinin ifade edilme düzeylerini tespit ederek araştırmak amaçlanmıştır.

1.3 Araştırmanın Hipotezleri

Araştırma sorusu: Çevresel kirleticilerden olan ve gıdaların teması yoluyla maruz kaldığımız PFDA'nın adipogenezi uyaran etkisini kurkumin ile baskılayabilir miyiz? Adipogenezde aktif olan transkripsiyon faktörü genlerin (*PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBF1*, *FASN*) ifadelenmesi bundan nasıl etkilenir?

Hipotezler:

H1: PFDA preadipositlerin olgun adipositlere dönüşümü sırasında hücrelerde lipit birikimini arttırır.

H2: PFDA preadipositlerin olgun adipositler dönüşümü sırasında *PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBF1* ve *FASN* genlerinin gen ifadelenmesini uyarır.

H3: Kurkumin preadipositlerin olgun adipositlere dönüşümü sırasında hücrelerde lipit birikimini azaltır.

H4: Kurkumin preadipositlerin olgun adipositler dönüşümü sırasında *PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBF1* ve *FASN* genlerinin gen ifadelenmesini baskılar.

H5: PFDA ve Kurkumin beraber kullanıldığında preadipositlerin olgun adipositlere dönüşümü sırasında kurkumin PFDA'nın hücrelerde arttırdığı lipit birikimini azaltır.

H6: PFDA ve Kurkumin beraber kullanıldığında preadipositlerin olgun adipositlere dönüşümü sırasında kurkumin, *PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBF1* ve *FASN* genlerinin gen ifadelenmesinin baskılanmasına neden olur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Obezite ve Adipogenez

2.1.1. Obezite

Obezite, sitoplazmada yağ birikmesi nedeniyle yağ hücresi boyutunun anormal bir şekilde genişlemesinden kaynaklanır. Obezitenin temel patogenezi, hücresel işlevler veya fiziksel aktivite yoluyla enerji alımı ve harcamasında dengesizlik içerir (8). Çeşitli endokrin değişkenler, insülin sinyalini, adipogenezi, adiposit öncesi çoğalmayı ve farklılaşmayı ve lipit metabolizması yoluyla mitokondriyal enerji dağılımının kontrolünü etkileyerek obezitenin ilerlemesinde kilit bir role sahiptir (9). Genetik, metabolik hız, endokrin fonksiyon ve beslenme obeziteye neden olan etkenlerdendir. Obezite araştırmalarının çoğu, obeziteye biyolojik yatkınlığın yanı sıra çevresel faktörlerin de etkili olduğunu göstermiştir (10). Obezite hem çocukları hem de yetişkinleri olumsuz etkileyen ve kardiyovasküler hastalık (hipertansiyon), hiperlipidemi, tip 2 diyabet, bunama ve çeşitli malignite türleri (gastrointestinal kanser, hepatosellüler karsinom gibi) dahil olmak üzere çok sayıda hastalığın etiyolojisini etkileyen önemli bir küresel beslenme sorunu olarak ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, obezitenin önlenmesi ve tedavisi, artan morbidite ve mortalite vakalarını azaltmak için kritik öneme sahiptir (1). Dünya sağlık örgütü 2022 yılı verilerine göre, 18 yaş ve üzeri 2,5 milyar yetişkin aşırı kiloludur ve bunların 890 milyondan fazlası obezite ile yaşamaktadır. Bu oran, 18 yaş ve üzeri yetişkinlerin %43'ünün (erkeklerin %43'ü ve kadınların %44'ü) aşırı kilolu olduğuna tekabül etmektedir. Aşırı kilo prevalansı bölgelere göre değişmektedir (11).

2.1.2. Adipogenez

Adipogenez, mezenkimal kökenli preadipositlerin olgun yağ hücrelerine dönüşmesini içeren farklılaşma süreci olarak tanımlanır (12). Adipogenez sürecinde doku adipositlerinde hem hipertrofi (boyutta artış) hem de hiperplazi (sayıda artış) oluşur (8). Bu süreç, başta *PPARγ* ve *C/EBPα* olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerinin koordineli aktivitesi ile düzenlenir. Bu faktörler, yağ hücrelerine özgü genlerin ekspresyonunu artırarak terminal farklılaşmayı başlatır ve sürdürür (12). *İn vitro* adipogenez, büyüme durması, mitotik klonal genişleme (MCE), erken farklılaşma ve terminal farklılaşma olmak üzere dört ana adımda gerçekleşir (13).

- Büyümeyi Durdurma

Preadipositler, konfluens noktasına gelerek G0/G1 fazında büyümeyi durdurur. Bu durma, farklılaşmanın başlaması için ön koşul oluşturur (14).

- Mitotik Klonal Genişleme (MCE)

Hücreler mitoz yoluyla birkaç kere bölünür. Bu evrede C/EBPβ, C/EBPδ ve MAPK/ERK gibi faktörler aktifleşir (15).

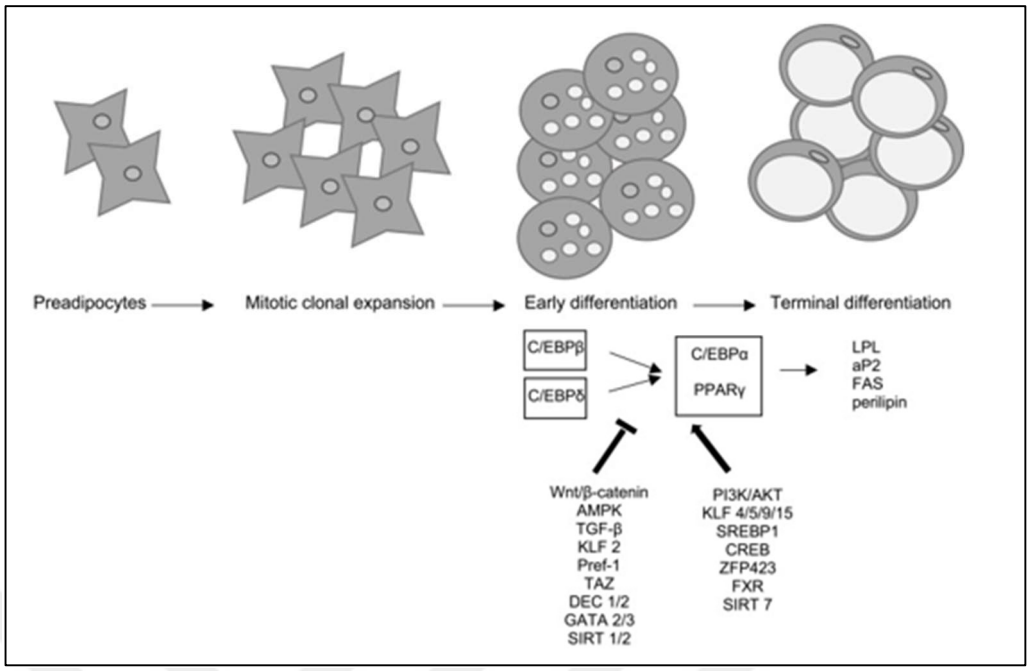
- Erken Farklılaşma

Bu aşamada C/EBPβ ve C/EBPδ aktifleşerek, *PPARγ* ve *C/EBPα* gibi ana adipogenez düzenleyicilerinin ekspresyonunu başlatır (16).

- Terminal Farklılaşma

PPARγ ve *C/EBPα* etkinleşerek adiposit tipine özgü genlerin (örneğin *aP2*, *FASN*, *GLUT4*) ifadesini artırır; lipit birikimi artar ve hücre olgun adiposit haline gelir (17).

Preadipositlerin ve adipogenezin inhibisyonu yoluyla obezitenin yönetilmesi ve vücut ağırlığının azaltılması sağlanabilir (8). Adiposit farklılaşmasının engellenmesi adipogenez ve dolayısıyla obeziteye karşı potansiyel terapötik strateji olarak kullanılabilir (1). Adiposit farklılaşması sürecinde birçok hücre içi sinyal yolu görev alır. Bunlar arasında; hücre büyümesi ve farklılaşmasıyla ilişkili MAPK/ERK (Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase) ekseni, farklılaşmayı engelleyen Wnt/β-katenin yolu ve enerji duyarlılığına yanıt olarak aktive olan AMPK (AMP-activated protein kinase) sinyal yolları öne çıkmaktadır. Bu yolaklar, adipogenez üzerinde uyarıcı ya da baskılayıcı etkiler göstererek sürecin yönünü belirlemektedir (2).



Şekil 1. Adipogenez süreci ve mekanizması (2).

2.2 Yağ Dokusu ve Murin Yağ Hücreleri

Yağ dokusu, insan vücudunda en yaygın şekilde bulunan doku türlerinden biridir ve genellikle deri altındaki gevşek bağ dokusunda yer alırken, iç organların çevresinde de bulunur. Bu doku büyük oranda olgun yağ hücrelerinden oluşur ancak yapısında farklı hücre tiplerine de rastlanır. Bu hücreler arasında düz kas hücreleri, perisitler, endotel hücreleri ile adipojenik progenitör hücreler ya da preadipositler gibi stromal-vasküler hücreler (SVC) yer alır. Fonksiyonel olarak yağ dokusu, kahverengi (BAT) ve beyaz (WAT) olmak üzere iki ana alt tipe ayrılır. Nadiren görülen kahverengi yağ dokusu, esas olarak vücut sıcaklığının korunmasında görev alırken; beyaz yağ dokusu daha yaygın bir dağılıma sahiptir ve başlıca yağ depolama ve metabolik düzenleme süreçlerinde rol oynar. Beyaz yağ dokusu hem insanlarda hem de hayvanlarda temel enerji rezervi işlevi görür; enerjiyi trigliserit formunda depolar ve enerji ihtiyacı doğduğunda bu rezervi serbest yağ asitlerine dönüştürerek kullanıma sunar. Enerji homeostazisi, enerji alımı ile harcaması arasındaki denge korunduğunda sağlanır. Bu dengenin bozulması, yani enerji alımının harcamadan fazla olması, vücut ağırlığında artışa neden olur (8). BAT ise soğuk ortamlara yanıt olarak ısı üretiminde önemli olan termojenez yoluyla enerji düzenlenmesinde önemlidir (18, 19).

2.3 Preadiposit 3T3-L1 Hücre Hattı

3T3-L1, bir farenin embriyosundan izole edilen bir fibroblasttır ve *in vitro* ortamda farklılaştırılarak adiposit özellikleri kazandırılabilir. Bu hücre hattı, diyabet, obezite ve bunlarla ilişkili metabolik bozuklukların altında yatan hücresel mekanizmaları araştırmak için yaygın olarak kullanılan bir modeldir. Son zamanlarda çevresel obezojenlerin de taranması için alternatif bir model olarak önerilen 3T3-L1 preadiposit hücre hattı, obezojenlerin lipit birikimi ve adiposit farklılaşması üzerindeki etkilerini araştırmaya yönelik *in vitro* modeller arasında yaygın olarak kullanılan ve etkinliği kanıtlanmış bir sistemdir (3). 3T3-L1 hücreleri fibroblast benzeri bir morfolojiye sahiptir, ancak uygun koşullar altında hücreler adiposit benzeri bir fenotipe farklılaşır ve bu da beyaz adipositler için bir model oluşturur (20). Bu hücre hattında, yağ birikimi ve farklılaşma süreçleri, başta *PPARγ* olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörlerinin kontrolünde, hassas bir genetik düzenlemeyle yönetilmektedir. *PPARγ*, adipogenez sürecinde temel bir düzenleyici rol üstlenerek bu hücresel dönüşümlerin başlatılmasında ve sürdürülmesinde kilit işlev görür (21).

2.4 *PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBF1* ve *FASN*'in Adipogenez ile İlişkisi

PPARγ geni Ppar ailesine ait olan nükleer reseptör proteinini kodlar ve kodlanan bu protein adiposit farklılaşması ve glukoz homeostazının düzenlenmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (22). Adiposit farklılaşması, başta C/EBP ailesi transkripsiyon faktörleri ile nükleer hormon reseptörü *PPARγ* olmak üzere çeşitli düzenleyici faktörler tarafından yönlendirilen karmaşık bir biyolojik süreçtir (23, 24). *PPARγ*, adiposit farklılaşma sürecinin temel düzenleyici faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu transkripsiyon faktörü, *C/EBPα* ile birlikte çalışarak adipositlere özgü genlerin ekspresyonunu artırır ve terminal farklılaşma sürecinin ilerlemesini destekler (25). Adipoz dokuda yüksek düzeyde eksprese edilen *PPARγ*'nın ifadesi, preadipositlerin erken farklılaşma evresinde başlamakta ve bu aşamadan itibaren farklılaşma sürecinin devamlılığında kritik görev üstlenmektedir (7). *PPARγ*'nin aktivasyonunun, adipogenez sürecini kolaylaştırdığı ve insüline duyarlı adipositlerin sayısının artmasına yol açtığı gösterilmiştir (26). Ek olarak, *PPARγ*'nin aktivasyonu, karaciğer ve kaslarda insülin duyarlılığını iyileştiren yağdan türetilen hormon

adiponektini yukarı yönde düzenler (27). *PPARγ*'nın aktivitesini modüle eden çevresel veya kimyasal etkenlerin adipogenez süreci üzerindeki etkileri büyük önem taşımaktadır. *PPARγ* adipojenik farklılaşmada önemli bir rol oynadığı ve insülin duyarlılaştırıcı ilaçlar için bir reseptör olduğu için, ifadesinin düzenlenmesi beslenme, obezite ve diyabet açısından önem taşır (19).

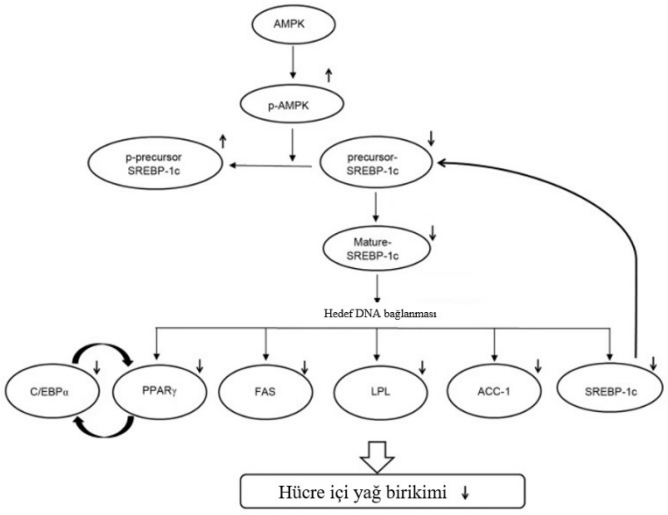
C/EBP'ler yağ hücresi farklılaşmasında önemli bir rol oynar (19). Bunlar son derece korunmuş bazik lösin fermuar proteinleri ailesine aittir ve in vivo yağ hücresi oluşumundaki önemleri, *C/EBP* genlerinin susturulmasının yağ hücrelerinde ciddi anormalliklere yol açtığı fare modelleri aracılığıyla gösterilmiştir (28). Özellikle, *C/EBPα* genellikle yağ dokusunda, karaciğerde, akciğerde, adrenal bezde ve plasentada ifade edilir (19). *C/EBPα* intronsuz bir gendir, temel bir lösin fermuar alanı içeren bir transkripsiyon faktörünü kodlar ve hedef genlerin promotörlerindeki CCAAT motifini tanır. Bu proteinin aktivitesi, hücre döngüsü düzenlemesinin yanı sıra vücut ağırlığı homeostazında yer alan genlerin ifadesini modüle edebilir (29). *C/EBPα*, adipogenezde geç dönemde indüklenir ve insülin bağımlı glikoz alımı için kritik öneme sahip olduğu olgun adipositlerde bol miktarda bulunur (28). *PPARγ*, preadipositlerin adipositlere farklılaşması sırasında indüklenir ve bu süreç için gereklidir. *PPARγ* olmadan, öncü hücreler olgun adipositlere farklılaşamaz (23). Dahası, *PPARγ*, *C/EBPα* eksikliği olan hücrelerde adiposit oluşumunu teşvik edebilir. Ancak, *C/EBPα*, *PPARγ* eksikliği olan hücrelerde adiposit oluşumunu teşvik edemez ve bu da *PPARγ*'nin adiposit oluşumunun ana düzenleyicisi olduğunu gösterir. *C/EBPα* eksikliği olan hücreler adipositlere farklılaşabilir ancak bu farklılaşma, daha az lipit damlacığı biriktirmeleri ve *PPARγ* ekspresyonunu indüklememeleri nedeniyle kusurludur (16).

Adipogenezin bilinen diğer düzenleyicilerinden diğeri ise sterol düzenleyici element bağlayıcı transkripsiyon faktörü 1 (*SREBF1*)'dir. *SREBF1* adipogenezi indükleyen pozitif düzenleyici olarak tanımlanmıştır. Adipojenik transkripsiyon faktörlerinin azaltılması, obezitenin ilerlemesi sırasında adipoz doku gelişimini engellemek için iyi bir yaklaşım olabilir. *SREBF1*, *PPARγ* aktivitesini artırarak adipogenezi güçlendirir (2). Bu gen, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör genini ve sterol biyosentezinde yer alan bazı genleri çevreleyen bir dekamer olan sterol düzenleyici element-1'e (SRE1) bağlanan bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Protein,

nükleer membrana ve endoplazmik retikuluma bağlı bir öncü olarak sentezlenir. Bölünmenin ardından olgun protein çekirdeğe taşınır ve SRE1'e bağlanarak transkripsiyonu aktive eder. Steroller prekürsörün bölünmesini inhibe eder ve olgun nükleer form hızla katabolize olur, böylece transkripsiyonu azaltır. Protein, temel sarmal-döngü-sarmal-lösin fermuar transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesidir (30). *SREBF1*, iki farklı araştırma grubu tarafından bağımsız olarak keşfedilmiş ve ADD1 ve SREBP-1c olarak adlandırılmıştır (23, 31). Bu gen, adipogenez sırasında indüklenir ve kültürlenmiş adipositlerde insülin tarafından daha fazla düzenlenir (17). Ek olarak, *SREBF1*, yağ asidi ve trigliserit metabolizmasıyla bağlantılı çeşitli genleri modüle edebilir ve ayrıca *PPARγ* promotöründe bulunan E kutusu motifleri aracılığıyla *PPARγ* gen ifadesinin indüklenmesi yoluyla adipogenezi düzenleyebilir. *SREBF1* artan ifadesi, ifadesini indükleyerek ve endojen bir *PPARγ* ligandının üretimini artırarak *PPARγ*'nin aktivasyonuna yol açar. Tüm bu transkripsiyonel faktörler, terminal olarak farklılaşmış fenotip için gereklidir (32). *SREBF1* geni, *SREBP1a* ve *SREBP1c* olmak üzere iki proteini kodlar ve izoform -1c, analiz edilen dokuların çoğunda baskın izoformdur (33). *SREBF1* farklı doku tiplerinde ifade edilir ancak ağırlıklı olarak kahverengi yağ dokusunda ifade edilir (34). *SREBF1*, yağ asidi metabolizmasında rol oynayan önemli genler olan *FASN* ve *LPL*'nin ifadesini düzenleyerek yağ hücresi gen ifadesinde rol oynar (19, 35).

FASN geni lipogenezle ilişkilidir ve adiposit fonksiyonlarında rol alır (36). Yağ asidi sentaz aktivitesini etkinleştirir ve yağ asidi biyosentez sürecinde rol oynar (37). *FASN*, yağ asidi biyosentezinin ana enzimi olup adipogenez sırasında 3T3-L1 hücrelerinde ekspresyonunda belirgin artış gözlenir. Artan *FASN* ekspresyonu hem transkripsiyonel hem post-transkripsiyonel kontrol mekanizmalarıyla regüle edilir ve bu süreç adiposit farklılaşmasını destekleyen trigliserit birikimini artırır (38). *AMPK* fosforile edilip aktifleştiğinde ve SREBP-1c ve yağ oluşturan enzimlerin aşağı düzenlenmesine yol açarak adipogenezin inhibisyonuna yol açtığını göstermektedir. Olgun *SREBP-1c* tarafından transkribe edilen ve yağ oluşturan enzimlerden biri olan *FASN*'nin ifadesi aşağı düzenlenir ve bunun sonucunda hücre içi yağ birikimi azalır (39).

Terminal farklılaşma fazının moleküler düzenlenmesi, *PPARγ*, *C/EBP*'ler ve *SREBP* gibi transkripsiyon faktörleri tarafından aracılık edilir. *PPARγ* ve *C/EBPα*, lipogenez, lipoliz ve insülin duyarlılığında rol oynayan adiposit protein-2 (*aP2*), lipoprotein lipaz (*LPL*) ve leptin ve adiponektin gibi adiposit belirteçleri gibi genlerin ifadesini uyarır. *SREBP1c*, asetil-CoA karboksilaz (*ACC*) ve yağ asidi sentaz (*FASN*) gibi enzimlerin ifadesini başlatır. Transkripsiyon faktörlerini ve bunların alt akış moleküllerini hedeflemek ve olası anti-obezite ajanlarını belirlemek farmakolojik öneme sahiptir (40).

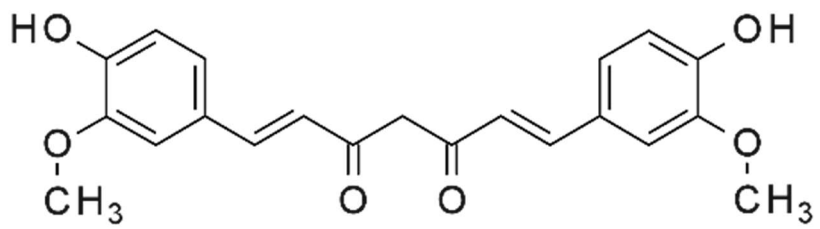


Şekil 2. Antiadipojenik moleküler mekanizmalar (41).

2.5 Kurkumin ve Adipogenez

Kurkumin, çok yıllık zerdeçal bitkisi (*Curcuma longa*) rizomlarında bulunan sarı renk pigmentli olup, aynı zamanda biyolojik açıdan aktif bir bileşiktir. Polifenol yapısında olan bu doğal bileşik, güçlü antioksidan, antiinflamatuar ve antikanserojen etkileriyle dikkat çekmektedir (42). Yapılan çeşitli araştırmalar, kurkuminin hem hücre kültürü sistemlerinde hem de hayvan modellerinde adipogenez sürecini baskılayıcı etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle *PPARγ* ve *C/EBPα* transkripsiyon faktörleri üzerinden işleyen adipojenik yolakları aşağı regüle ederek, 3T3-L1 preadipositlerinin yağ hücrelerine dönüşümünü engellediği rapor edilmiştir. Ayrıca son klinik veriler, kurkuminin tip 2 diyabet hastalarında serum trigliserit seviyelerini düşürebileceğini göstermektedir (4). Antiadipojenik etkisi ile kurkuminin

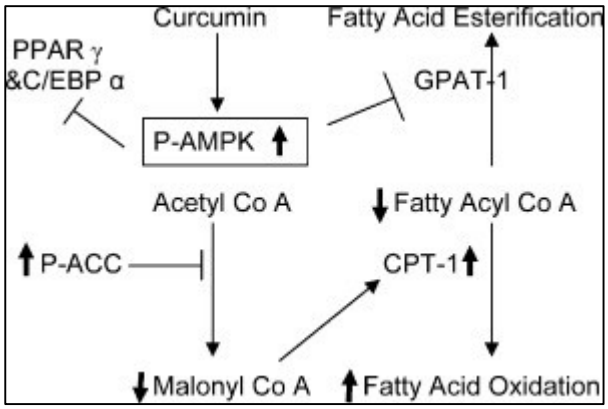
obezite ve ilişkili metabolik bozuklukların önlenmesinde potansiyel taşıdığı düşünülmektedir (6). Bazı çalışmalarda kurkuminin, preadipositlerde apoptoz sürecini tetiklediği ve adiposit farklılaşmasını baskıladığı gözlemlenmiştir (43). Mitotik klonal genişleme sürecini modüle ederek erken farklılaşma evrelerinde etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu nedenle kurkuminin etkisinin çoğunlukla adipogenez sürecinin başlangıç aşamalarıyla sınırlı kaldığı öne sürülmektedir (42). Ayrıca, kurkuminin adiposit farklılaşmasını doza bağımlı bir şekilde inhibe edebildiği belirtilmiştir. Yapılan *in vitro* deneysel çalışmalar, kurkuminin 3T3-L1 hücrelerinde adipogenezi baskıladığını, *in vivo* çalışmalar ise fare modellerinde yağ dokusu oluşumunu azalttığını ve lipit birikimini sınırladığını göstermiştir (1, 44).



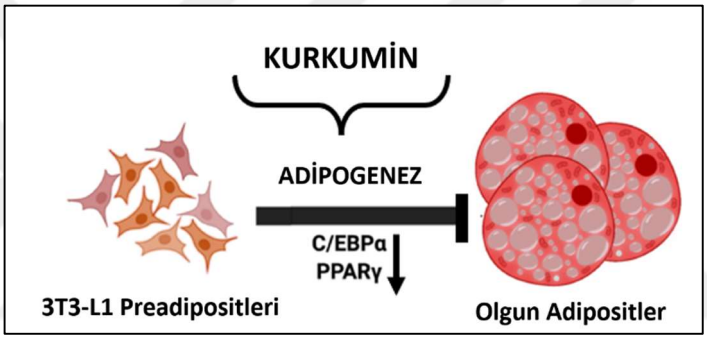
Şekil 3. Kurkuminin kimyasal yapısı (45).

2.5.1. AMPK Aktivasyonu

Kurkuminin, hücresel enerji dengesi üzerinde etkili olan *AMPK* (AMP-activated protein kinase) ve *ACC* (asetil-CoA karboksilaz) enzimlerinin fosforilasyon düzeylerini artırdığı rapor edilmiştir. Bu fosforilasyon, asetil-CoA'nın malonil-CoA'ya dönüşümünü baskılayarak hücre içi malonil-CoA seviyelerinin düşmesine neden olur. Azalan malonil-CoA düzeyi, mitokondriyal dış membranda yer alan *CPT-1* (Carnitine palmitoyltransferase-1) enziminin aktivitesini artırarak yağ asidi oksidasyonunu teşvik eder. Diğer yandan, fosforile AMPK'nın, yağ asidi esterifikasyonu için kritik bir enzim olan *GPAT-1* (glycerol-3-phosphate acyltransferase-1) ifadesini azalttığı ve böylece trigliserit sentezinin baskılandığı gösterilmiştir. Ayrıca, aktif *AMPK*, adipogenezde temel rol oynayan transkripsiyon faktörleri *PPARγ* ve *C/EBPα*'nın ekspresyonunu inhibe ederek yağ hücresi farklılaşmasının önüne geçebilir (1).



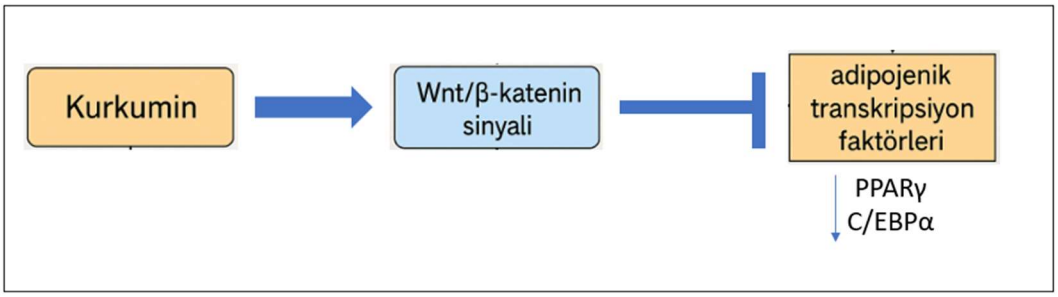
Şekil 4. Kurkuminin lipit ve enerji metabolizması üzerindeki etkisi (1).



Şekil 5. Kurkumin ve adipogenez arasındaki ilişki.

2.5.2. Wnt/β-Katenin Sinyal Yolağı Aktivasyonu

Wnt/β-catenin sinyali, adipogenezin baskılanmasında rol oynar. Kurkumin, bu yolu aktive ederek *C/EBPα* ve *PPARγ* gibi adipojenik transkripsiyon faktörlerini bastırır. Böylece yağ hücresi oluşumu azalır (46). Wnt sinyallemesi β-katenin stabilizasyonunu ve nükleer translokasyonunu teşvik ederek *C/EBPα* ve *PPARγ*'nin aşağı akış inhibisyonuna neden olur (47). Bu mekanizma çerçevesinde, β-katenin stabilizasyonu ve nükleer lokalizasyonu, yağ hücresi oluşumunun önlenmesinde kritik bir basamak olarak görülmekte ve bu nedenle obeziteyle mücadelede terapötik bir hedef olarak değerlendirilmektedir (2). Kısaca Wnt sinyali, β-katenin artışına sebep olarak adipojenik transkripsiyon faktörlerini baskılar (46).

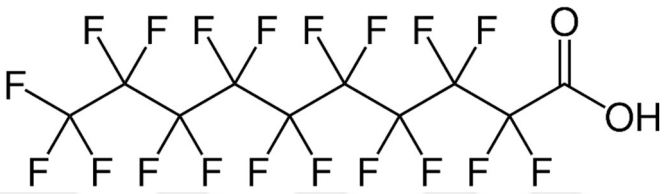


Şekil 6. Wnt/β-katenin sinyali ve adipojenik transkripsiyon faktörleri.

2.6 PFDA ve Adipogenez

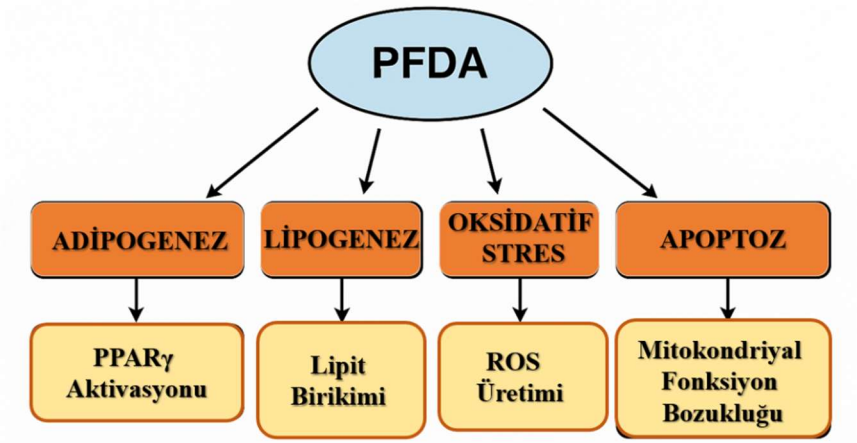
Çevresel obezojenler (ftalat, plastik, PFC'ler, bisfenoller ve türevleri) olarak da adlandırılan çevresel kimyasallara maruz kalmanın insan metabolizmasını değiştirebileceğini, bazı insanları kilo almaya yatkın hale getirebileceğini, obezite ve metabolik bozuklukların gelişimine katkıda bulunabileceğini çalışmalar göstermektedir (4). Perflorodekanoik asit (PFDA, $C_{10}HF_{19}O_2$), gıda paketleme ve pişirme kapları gibi gıda uygulamalarında yaygın olarak kullanılan, toksik ve kirletici bir kimyasaldır. Perflorlu bileşikler (PFC'ler), çeşitli tüketici ve endüstriyel uygulamalara sahip insan yapımı kimyasallardır. Bazı çalışmalar insanlarda PFC'ler ile obezite arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir. PFC'ler endokrin bozucu bileşikler olarak tanımlanmıştır ve bu tür bileşiklerin hem hayvanlarda hem de insanlarda obeziteyi ve metabolik bozuklukları tetiklediği bulunmuştur (5). Perflorodekanoik asit, endüstride gıda ambalajı ve tencere seti, halı, kumaş ve yangın söndürme köpüğünün kimyasal üretiminde onlarca yıldır kullanılmaktadır. PFDA yüksek uygulama performansına sahip olmasına rağmen oldukça toksik bir PFC'dir ve kalıcı bir çevre kirletici olarak kabul edilir. PFDA'nın artan kullanımı, bunun sonucunda çevresel kirlenmeye ve insanlar için birçok riske neden olmuştur. Riskler öncelikle gıda ambalajı ve pişirme kaplarından ve daha az ölçüde de gıdalar ve içme suyundan kaynaklanmaktadır. PFDA'nın, HepG2 ve 3T3-L1 hücrelerinde adipogenezi teşvik ettiği ve hücresel trigliserit birikimini arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmada PFDA, inflamatuar aracılı *SREBF1* ekspresyonunu aktive etmiştir (5). PFDA'nın, ayrıca erkek C57BL/6J farelerinin üstünde yapılan çalışmada hepatik lipit birikimini güçlendirdiği de bulunmuştur (48). Gıdayla temas eden endokrin bozucu

kimyasal olan ftalatlar ile yapılan diğer çalışmalar, bu tür kimyasalların 3T3-L1 hücrelerinde adipogenezi indüklemiş olduğunu doğrulamıştır ve ardından eklenen kurkumin ile adipogenez inhibe edilmiştir (4). Ftalatlar genellikle plastik malzemelerde plastikleştirici olarak kullanılır. Bu nedenle gıda ambalajı, mobilya, oyuncak ve hatta tıbbi cihazlar gibi çok sayıda üründe bulunurlar. Ftalatlar vücuda solunum, sindirim veya deri yoluyla maruz kalarak girebilir. Bir endokrin bozucu olan benzil bütil ftalata (BBP) maruz kalan 3T3-L1 hücrelerinde, trigliserit seviyelerinde önemli bir artış gözlenmiştir. BBP'li ortama eklenen kurkumin takviyesi ile *PPARγ* ve *C/EBPa* mRNA seviyeleri azalmıştır (4). Çalışmamızda kullandığımız PFDA da gıda uygulamalarında kullanılan toksik bir kimyasaldır (5).



Şekil 7. PFDA'nın kimyasal yapısı.

PFDA, *SREBF1* ekspresyonunu hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde aktive ederek adipogenezi teşvik eder. Yağ asidi biyosentezinden ve kolesterol sentezinden sorumlu enzimler sırasıyla *FASN* ve hidroksimetilglutaril koenzim A sentazdır (*HMGCS*) (36). *SREBF1*, *HMGCS* ve *FASN* genlerini promotörlerinden fonksiyonel olarak düzenler ve NLRP3 (The nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain containing receptor 3) inflamazomu aktivasyonu yoluyla lipogeneze ve lipit damlacık oluşumuna katkıda bulunduklarını gösterilmiştir. PFDA, 3T3-L1 adipositlerinde konsantrasyona bağlı olarak hücresel trigliserit birikimini ve trigliserit içeriğini desteklemekte ayrıca, *FASN* ve *HMGCS* dahil olmak üzere lipojenik gen ekspresyonunu indükleyici etki göstermektedir (5).



Şekil 8. 3T3-L1 hücre hattında PFDA'nın potansiyel mekanizmaları.

PFDA, 3T3-L1 hücrelerinde *PPARγ* nükleer reseptörünü aktive ederek adipogenezi destekler. Bu reseptör, *C/EBPα* gibi transkripsiyon faktörleri ile birlikte çalışarak yağ hücrelerinin olgunlaşmasını sağlar. PFAS (per- ve polifloroalkil maddeler) bileşiklerinin *PPARγ*'ya bağlanarak adipogenezi arttırdığı gösterilmiştir (49). PFDA muhtemelen NLRP3 inflammasomun aktivasyonuna neden olur, bu da lipogenez genlerinin (örneğin *FASN* ve *SREBF1*) seviyesini artırarak lipit metabolizmasını uyarır (5, 50). Bu moleküler değişiklikler, 3T3-L1 hücrelerinde adiposit farklılaşması ve trigliserit birikimi ile sonuçlanır. PFDA dahil olmak üzere perflorlu bileşikler lipit akümülasyonunu ve lipogenez genlerini yukarı regüle eder (49).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Deneysel-*in vitro* bir çalışmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Şubat 2024 ile Haziran 2025 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB) alt yapı ve olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Araştırma Planı

Ekim 2023	Etik kurul onayı
Ekim-Kasım 2023	Tez önerisinin hazırlanması ve kabulü
Aralık 2023	Proje önerisinin hazırlanması
Ocak 2024-Temmuz 2024	Projenin kabul edilmesi Malzeme alımları
Şubat 2024-Mart 2025	Hücre Kültürü Çalışmaları, Hücrelerin çözülmesi ve çoğaltılması, farklılaştırma süreci
Nisan 2024-Aralık 2024	Perflorodekanoik asit (PFDA) ve Kurkumin konsantrasyonlarının uygulamaları ve Hücre canlılığı (sitotoksisite) testleri
Nisan 2024-Ekim 2024	Oil Red-O Boyama
Aralık 2024-Mart 2025	RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)
Şubat 2024-Mayıs 2025	Bulguların değerlendirilmesi ve istatistiksel analizleri
Eylül 2024-Haziran 2025	Tez yazım aşaması

3.3 Çalışma Materyali

3T3-L1 fare fibroblast hücre hattı (ATCC, CL-173)

3.4 Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken; Perflorodekanoik asit ve Kurkumin dozları

Bağımlı değişken; *PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBF1*, *FASN* gen ekspresyonu

3.5 Veri Toplama Araçları

3.5.1 Çalışmada kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Tablo 2. Proje kapsamında kullanılan kimyasal malzeme ve sarfların listesi

Malzeme İsmi	Marka/Kod	Kullanım Gerekçesi
3T3-L1 fare hücre hattı	ATCC CL-173	Adipogenezle ilgili yaygın kullanılan hücre hattı
WST-1 kiti	Cayman 10008883.480T	Sitotoksik değerlendirme testi ve canlılık ölçümü
Yüksek glikozlu DMEM	Euroclone ECM0103L	Hücre kültürü için besiyeri
Fetal sığır serumu (FBS)	Capricorn FBS-HI-11A	Hücre büyümesi için serum
Penisilin/Streptomisin (P/S) Antibiyotik 100X	Gibco 715140122	Hücre besiyeri için antibiyotik
Stabil L-Glutamin (200mM)	Gibco 25030024	Hücre besiyeri için aminoasit
Tripsin-EDTA %0.25	Gibco 25200056	Hücrenin yüzeyden kaldırılması
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	Sigma I5879	Preadiposit-adiposit farklılaştırması
Dexametason	Sigma D4902	Preadiposit-adiposit farklılaştırması

İnsülin	Sigma I0516	Preadiposit-adiposit farklılaştırması
Kurkumin	Santa Cruz	Adipogenez sürecine etkisine bakılacak madde
Perfluorodecanoic acid (PFDA)	Thermo Scientific Chemicals B22292.06	Adipogenez sürecine etkisine bakılacak madde
Oil Red-O (ORO) boya	Sigma O0625	Hücre içi lipit boyaması
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Santa Cruz	Kurkumin ve PFDA hazırlama, Hücre dondurma
NucleoZOL	Macherey–Nagel 740404.200	Total RNA izolasyonu
cDNA sentezi kiti	ABM G236	Total RNA'dan komplementer DNA elde edilmesi
BlasTaq 2X qPCR Master Mix kiti	ABM G891	RT-qPCR ile ilgili gen ekspresyonlarına bakılması
Steril distile su DNase/RNase free	Thermo 10977035	RNA izolasyonu deneyinde kullanmak, PBS hazırlamak vb.
25cm^2 Cell Culture Flask (T25)	Jetbiofil TCF012050	Hücre ekimi için plastik lab. malzemesi
75cm^2 Cell Culture Flask (T75)	Jetbiofil TCF012250	Hücre ekimi için plastik lab. malzemesi
10µL Fitreli Pipet Ucu	Sarstedt MFTR10-96	Çoğu lab. uygulaması için ölçülü DNase-RNase free ve steril pipet uçları
100µL Fitreli Pipet Ucu	Sarstedt MFTR100-96	Çoğu lab. uygulaması için ölçülü DNase-RNase free ve steril pipet uçları

1000µL Fitreli Pipet Ucu	Sarstedt MFTR1000-96	Çoğu lab. uygulaması için ölçülü DNase-RNase free ve steril pipet uçları
6 Well Plate	Corning	Hücre ekimi için plastik lab. malzemesi
12 Well Plate	Jetbiofil 220200	Hücre ekimi için plastik lab. malzemesi
96 Well Plate	Sarstedt 3924	Hücre ekimi için plastik lab. malzemesi
15 mL santrifüj tüpü-steril-vidalı kapak	M.Plastic CTF-15	Hücre pasajlama, sayım ve dondurma gibi işlemler için santrifüj yaparken kullanılmakta
50 mL santrifüj tüpü-steril-vidalı kapak	M.Plastic CTF-50	Besiyeri hazırlama için plastik lab. malzemesi
5 mL steril tek kullanımlık dereceli Serolojik Pipet	Sarstedt 1253001	Çoğu lab. uygulaması için ölçülü ve steril serolojik pipetler
10 mL steril tek kullanımlık dereceli Serolojik Pipet	Sarstedt 1254001	Çoğu lab. uygulaması için ölçülü ve steril serolojik pipetler
25 mL steril tek kullanımlık dereceli Serolojik Pipet	Jetbiofil GSP010025	Çoğu lab. uygulaması için ölçülü ve steril serolojik pipetler
2 cc enjektör plastik	Beybi	Hücre uygulamalarında eski besiyerini çekip taze besiyerini eklemek, Tripsin ve FBS aliquatlama yapmak, Oil Red-O boyama gibi işlemlerde kullanılmaktadır.
5 cc enjektör plastik	Beybi	Hücre uygulamalarında eski besiyerini çekip taze besiyerini eklemek, Tripsin ve FBS

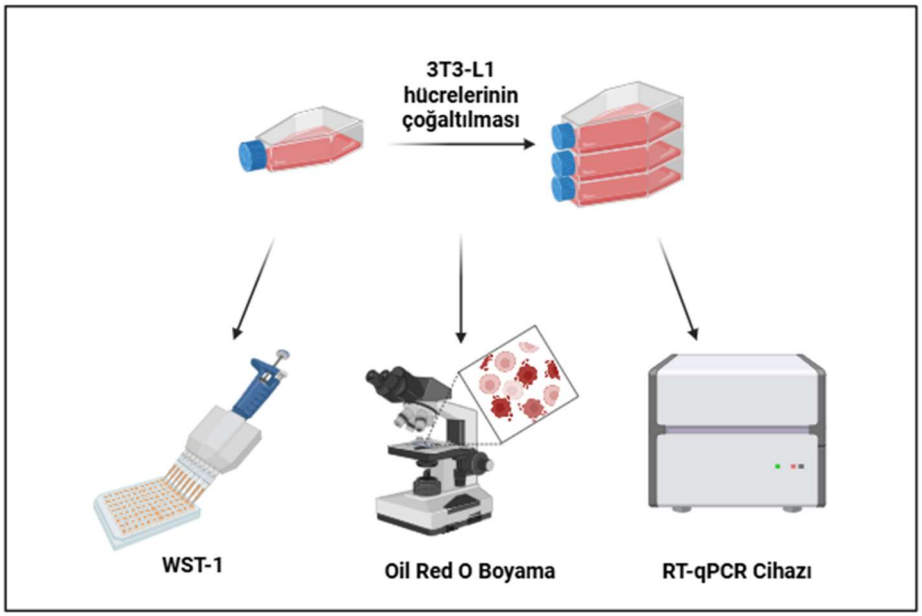
		aliquatlama yapmak, Oil Red-O boyama gibi işlemlerde kullanılmaktadır.
Steril filtre (0,22 μm)	Biosharp	Dışarıda hazırlanan toz malzemeleri hücrede kullanmak için sterilizasyon
Primerler-50 nmol Desalt-100 baz	Oligomer Omer50 Primer Sentez 50nmol, 1 baz (100 baz)	Adipogenezle ilgili ekspresyonları incelenecek genler *SREBF1* ve *FASN*
Tripan mavisi	Sigma	Hücre sayımı
Etanol	TEKKİM %96'lık	Hücre kültürü uygulamaları için dezenfeksiyon

Tablo 3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlara ait bilgiler

CO_2 İnkübatörü	Nuarie-5500E	Hücrelerin bulundurulması
Etüv	Memmert	Hücre kültüründe kullanılacak malzemelerin ısıtılması
Laminar Akımlı Kabinet (Sınıf 2)	Heraeus HERAsafe	Hücrelerin steril çalışmaları
Faz kontrast invert mikroskop	Nikon-Elwd	Hücrelerin mikroskobik incelenmesi
Santrifüj	Hettich-Rotofix 32	Hücre çöktürme
Soğutmalı santrifüj	Sigma-2k15c	RNA izolasyonu, PCR vb. işlemlerde
Şarjlı pipetör	Thermo	Serolojik pipet uygulamaları

Otoklav	Hırayama-Hıclave Hv-50	Sterilizasyon
Derin Dondurucu -80 C	Thermo ABD	Hücre saklanması ve dondurulması
Vorteks	Wised (VM-10)	Solüsyon karışımı
Buzdolabı +4 C ve Buzluk -20 C	Profilo	Hücre, RNA, cDNA, hazırlanmış malzemelerin depolanması
Nanodrop cihazı	Implen-Np80	Nükleotit miktarına bakılması
Termal cycler	Bio-Rad	cDNA sentezi, PCR
RT-qPCR cihazı	Roche Lightcycler 480	Gen ekspresyon analizi (Gerçek Zamanlı PCR)
Mikroplak Okuyucu	Biotek-Synergy Ht	Absorbans ölçümü
Distile su cihazı	Reservoir USF-Elga	Saf su temini
Hassas terazi	Sartorious-Bp221s	Toz malzemelerin tartımı
Buz makinası	Ims- S50	RNA izolasyonu, PCR vb. işlemlerde tüpler için soğuk çalışma ortamı sağlamak

3.5.2 Kullanılan Metotlar



Şekil 9. Çalışmada uygulanan metotların akış şeması (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.5.2.1 Hücre Kültürü

Yağ hücresinin farklılaşmasında en yaygın olarak kullanılan 3T3-L1 preadiposit hücre hattı ATCC'den (CL-173) satın alındı.

Hücreler rutin olarak %10 FBS (Capricorn, FBS-HI-11A) ve %1 P/S antibiyotik (Gibco, 715140122) ile desteklenmiş yüksek glikozlu DMEM (Euroclone, ECM0103L) içinde %5 CO_2 atmosferinde 37°C'de kültürlendi. Hücreler, laminar kabinde (HERAsafe) 25 cm^2'lik flasklara ekildi ve %10 FBS/DMEM'de inkübe edildi. Hücrelerin ekiminin yapılacağı flask önceden CO_2 inkübatöründe ısıtıldı. -80°C derin dondurucudan çıkarılan hücre kriyoviali önceden 37°C'ye ısıtılmış su banyosunda hafifçe çalkalayarak çözüldü. Çözülen hücreler 15 mL'lik tüpe alındı ve üzerine tam besiyeri eklenip 1500 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün içindeki süpernatant atıldı, pelletin üzerine taze besiyeri eklendi ve pipetaj yapılarak homojen hale getirildi ve her flask için 3 ml olacak şekilde besiyeri eklendi ve T25'lik flasklara ekim yapıldı. Hücre kültür besiyeri iki günde bir değiştirilerek hücreler çoğaltıldı. Hücrelerin çoğaltılma ve pasajlanma sırasında konfluent olmamasına dikkat edildi.

3T3-L1 hücreleri farklılaşmak için kontakt inhibisyona ihtiyaç duymaktadırlar. Hücrelerin farklılaşma yeteneklerini kaybetmemeleri için %70-80 düzeyinde yoğunluğa ulaştıklarında alt kültür için tripsinize edilerek yeni flasklara pasajları yapıldı.

3.5.2.2 Hücre Pasajlama ve Dondurma

T25 flask için yaklaşık 75.000 hücre ekildi. Hücreler %70-80 çoğaldıklarında kontakt inhibisyonu engellemek için yeni kültür kaplarına pasajlandı. Eski ortam atıldı ve hücre yüzeyi 1X PBS ile yıkandı. Ardından T25 flask için 1,5 mL Tripsin-EDTA (Gibco, 25200056) ile hücreler 2-3 dakika CO_2 inkübatöründe bekletildi. İnvert mikroskopta kalktıkları ve yüzdükleri görüldükten sonra tripsin miktarının iki katı kadar taze besiyeri eklendi ve tripsin enziminin aktivasyonu sonlandırıldı. Bütün hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne kondu ve 1500 rpm 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden gelen tüpün süpernatantı atılıp pelletin üzerine 1 mL taze besiyeri eklendi ve tripan mavisiyle thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Süspansiyondan 50 µL örnek alındı ve üzerine 50 µL tripan mavisinden eklendi (1:1 oranında dilüsyon). Ölü hücrelerin zar yapısı bozulduğu için mavi renkte boyandı. Canlı hücreler ise boyayı almadı.

1 mL'deki hücre sayısı = Canlı hücre sayısı x Dilüsyon faktörü x 10^4

Gerekli hücre sayısı ve besiyeri miktar hesabı yapılarak pasajlanacak hücreler 1:5 oranında yeni T25'lere ekildi. Bu şekilde çoğaltılan 3T3-L1 hücrelerinin bir kısmı daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere bir vialde 1 mL'de 1.000.000 hücre olacak şekilde dondurulduu. Bu işlem DMEM içinde %5 DMSO (Santa Cruz) içerecek şekilde hesaplandı. -80°C sıcaklıkta saklandı.

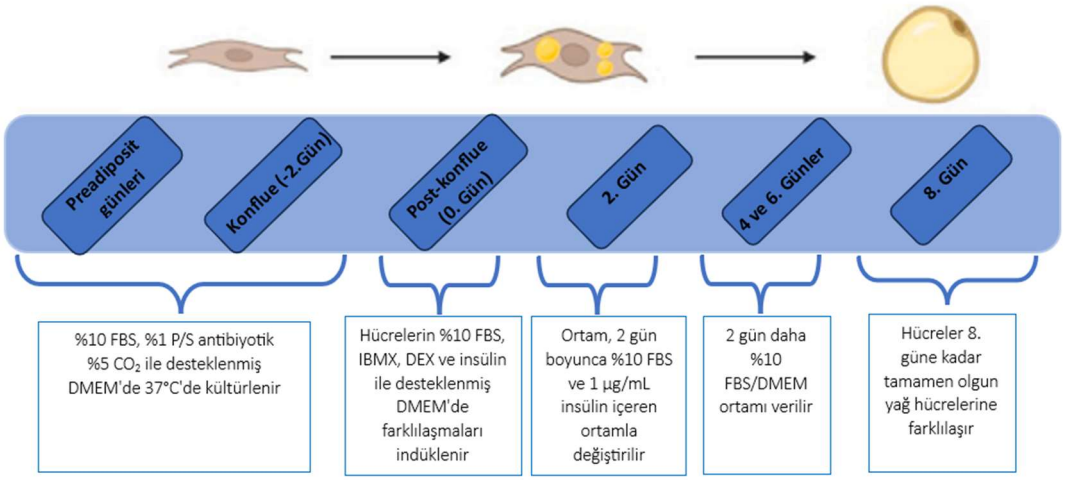
3.5.2.3 Diferensiyasyon (Farklılaştırma) Protokolü

Deney setini kurmak ve farklılaştırma yapmak için hücreler %70-80 oranında çoğaldıklarında hücre sayımı yapılarak kuyu başına yaklaşık 100.000-150.000 hücre olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür kaplarına ekildi. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşması için %100 konfluensiye ulaşması ve iki gün daha post-konflu beklemesi gerekir. Bu sebeple iki gün sonra hücrelerin besiyeri değiştirildi (%100 konfluent).

Konfluensiden iki gün sonra (0. gün), hücreler %10 FBS, 0.5 mM IBMX (Sigma, I5879), 1 µM DEX (Sigma, D4902) ve 1 µg/mL insülin (Sigma, I0516) ile desteklenmiş DMEM ile farklılaşma için indüklendi (DF_1). 2. günde, ortam %10 FBS ve 1 µg/mL insülin içeren ortamla (DF_2) değiştirildi ve ardından 2 gün daha %10 FBS/DMEM besiyeri uygulandı. Hücreler 8. günde tamamen olgun adipositlere farklılaştı (3, 20, 51).

Tablo 4. 3T3-L1 preadipositlerin adipojenik farklılaşma prosedürü (52)

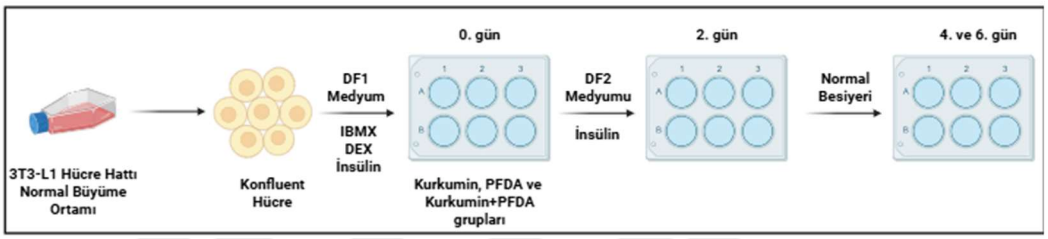
Günler	Uygulama
-2	%100 konfluent hücreler inkübatörde 48 saat bekletildi → Normal büyüme besiyeri (DMEM+FBS+P\S)
0	Konfluent-sonrası hücrelere belirlenen dozlarda kurkumin, PFDA, kurkumin+PFDA ve adipojenik medyum uygulandı (Normal büyüme ortamı+DEX+IBMX+insülin)
2	Adiposit maintenance medium (Büyüme ortamı +insülin)
4-6	Her 48 saatte bir ortam değiştirildi → Normal büyüme besiyeri
8	Oil Red-O boyama, RNA izolasyonu



Şekil 10. 3T3-L1 hücrelerinin adipojenik farklılaşma prosedürü.

3.5.2.4 Kurkumin ve PFDA Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

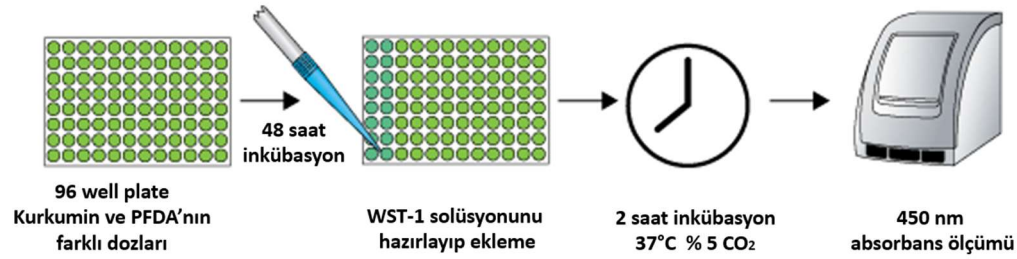
Kurkumin (Santa Cruz) ve PFDA (Thermo Scientific Chemicals) konsantrasyonu 250 mM olacak şekilde DMSO (Santa Cruz) içerisinde çözülerek hazırlandı ve sonra DMSO oranı %0,1 olacak şekilde besiyeri içerisinde seyreltildi. Steril ortamda 0,22 µm' lık steril filtreden geçirildi ve -20°C' de saklandı (4,5,42). Hücre kültürü çalışmamızda literatür taramaları doğrultusunda madde uygulamaları (kurkumin ve PFDA) ilk olarak farklılaşma aşamasında (0. gün) eklendi. Etkisi araştırılan iki madde DMSO'da çözülerek hazırlandığı için kontrol grubu olarak farklılaştırma besiyerinin (DF_1) içine, oranı %0,1 olacak şekilde DMSO eklendi.



Şekil 11. Deney aşamaları (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

3.5.2.5 Sitotoksisite (WST-1) Testi

WST-1 (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)- 2H tetrazolyum tuzları yapısında olup hücre canlılığını ve sitotoksisite düzeylerini belirlemek amacıyla kullanılır ve sonuçlar, spektrofotometrik olarak ölçülen renk değişimlerine dayanır. Hücrelerde yer alan mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin metabolik aktiviteleri sonucunda oluşan formazan ürünleri suda çözünür niteliktedir; dolayısıyla DMSO ile çözündürme adımına gerek kalmaz. Bu özellik, yöntemin hem doğruluğunu hem de pratikliğini artırmaktadır (53).



Şekil 12. 96 kuyulu plakada WST-1 deneyi aşamaları.

Çalışmamızda kurkumin, PFDA ve kurkumin+PFDA kombinasyonunun proliferasyon üzerindeki etkisi WST-1 (Cayman Chemical, 10008883) testi ile değerlendirildi.

- Hücreler sayıldı ve 96 kuyulu plakalara kuyu başına yaklaşık 6000 hücre ekilerek adipoz farklılaşma sürecine uygun olarak inkübe edildi.
- 2 gün sonra %100 konfluensiye ulaşan hücrelerin besiyeri tazelendi. 48 saat sonra farklılaştırma besiyeriyle beraber literatüre ve yapılan ön deneylere göre belirlenen farklı kurkumin, PFDA ve kurkumin+PFDA konsantrasyonları 96 kuyucuklu plakalara ekilen hücrelere eklendi. 48 saatlik inkübasyon gerçekleştirildi.
- Her bir kuyucuk için 10 µL WST-1 solüsyonu eklendi, plakalar 2 saat boyunca 37°C ve %5 CO_2 içeren inkübatörde inkübe edildikten sonra ELISA okuyucu ile 450 nm'de ölçüm yapıldı. Tüm deneyler 3 kez tekrarlandı.
- Kurkumin ve PFDA maddeleri DMSO içinde çözüldüğü için DMSO-kontrolü hücre canlılığı açısından ölçüldü ve %100 canlılık olarak kabul edildi. % hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

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

3.5.2.6 Deney Grupları

Kurkumin ve PFDA uygulanmayan, DMSO-kontrol hücre grubununun absorbansı %100 canlılık olarak kabul edilip hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyon IC_{50} değeri olarak hesaplandı. WST-1 ve Oil Red-O boyama deneylerinin sonuçlarına göre Kurkumin, PFDA ve Kurkumin+PFDA bileşikleri için deney grupları ve kontrol grubu oluşturuldu. Farklı konsantrasyonlar karşılaştırılarak en etkili kurkumin ve PFDA konsantrasyonları belirlendi. 96 kuyulu plakada yapılan WST-1 testine göre IC_{50} değerinin altındaki etkili dozlar seçildi.

Tablo 5. Deney grupları için seçilen dozlar

Kurkumin	PFDA	Kurkumin+PFDA Kombinasyon
20 µM	50 µM	20 µM + 50 µM
30 µM	75 µM	20 µM + 75 µM
		30 µM + 50 µM
		30 µM + 75 µM

3.5.2.7 Oil Red-O Boyama

Oil Red-O boyama, hücre ya da doku örneklerinde nötral lipitlerin (özellikle trigliserid ve esterleşmiş kolesterol gibi) belirlenmesi amacıyla kullanılan, yağda çözünebilen özel bir boyama tekniğidir. Bu yöntem, genellikle adipogenez, obezite, diyabet ve lipit metabolizması üzerine yapılan çalışmalarda hücre içi yağ birikimini görünür kılmak için tercih edilir. Boyama sonrası lipit birikimleri mikroskop altında kırmızı renkte gözlemlenir. Donmuş kesitlerde veya hücre kültürlerinde uygulanabilir olması, bu yöntemi laboratuvar araştırmalarında oldukça pratik ve yaygın hâle getirmiştir (54). Farklılaşma ve hücre içi lipit birikiminin analiz edilebilmesi amacıyla, deney ve kontrol gruplarındaki hücreler 8. gün sonunda Oil Red-O boyama yöntemiyle incelendi. Öncelikle %0,5'lik ana stok ve ardından çalışma solüsyonu hazırlandı.

Oil Red-O toz boyasının %0,5'lik ana stok hazırlanması: 0,2 gram tartılan Oil Red-O (Sigma, O0625) toz boyası 40 mL izopropanol ile karıştırıldı (55). Hazırlanan ana stok oda sıcaklığında alüminyum folyoya sarılı şekilde bir gece saklandı.

Çalışma solüsyonunun hazırlanması: Bu solüsyon çalışma yapılacağı zaman 3:2 oranında (3 birim boya:2 birim dH_2O oranında) distile su ile seyreltildi ve 0,22 µm'lık filtreden geçirildi.

Tablo 6. Oil Red-O Boyama uygulama basamakları

Uygulama Basamakları	Zaman
Hücrelerin eski besiyeri atılır ve 1X PBS ile yıkama	-
Hücreleri %4 paraformaldehit (PFA) ile sabitleme (pH 7.4)	45 dakika - 1 saat
% 60 izopropanol ile yıkama	-
% 0.5'lik Oil Red-O ile boyama	15 dakika
3-4 kere dH_2O ile yıkama	-
İnvert mikroskop ile görüntüleme	-
Görüntüleme sonrası boyayı %100 izopropanol ile 5 dakika elüe etme ve spektrofotometrede kantitatif ölçüm	-

Lipit birikimini ölçmek için, boyanan 3T3-L1 hücreleri %100 izopropanol ile elüe edilip 5 dakika beklendi ve elde edilen solüsyonun absorbansı 510 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu aracılığıyla ölçüldü (1).



Şekil 13. Boyama sonrası invert mikroskopta temsili görüntü.

3.5.2.8 RNA İzolasyonu

Hücreler belirlenen dozlarda kurkumin ve PFDA dozları ile muamele edildi. Total mRNA izolasyonu analizleri lipit taneciklerinin en yoğun olduğu farklılaşmanın 8. gününde yapıldı (Şekil 14).

Total RNA İzolasyonu Protokolü (6 kuyulu plaka için)

1. Kısım: Hücre Lizizi (Şekil 14A)

1. Hücrenin eski besiyeri çekip atıldı. Buz üzerinde çalışıldı.
2. İki kere soğuk 1X PBS (1 mL) ile yıkama yapıldı.
3. 500 µL NükleoZOL reaktifi (740,404.200, Macherey-Nagel) eklendi (56).
4. NükleoZOL eklenmiş haliyle bütün sıvı toplandı. Etiketli tüplere eklendi.

2. Kısım: Diğer Kontaminantların Presipitasyonu (Çöktürülmesi) (Şekil 14B)

1. Nükleozol içeren etiketli tüplere 200 µL Nükleaz-free dH_2O eklendi (5 birim nükleozol:2 birim su).
2. 15 saniye vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
3. Ardından 15 dakika 12.000 rcm +4°C'de santrifüj yapıldı.

3. Kısım: Total RNA Presipitasyonu (Şekil 14C)

1. Santrifüjden gelen tüplerin süpernatantı etiketli diğer tüplere aktarıldı (500 µL).
2. Üzerlerine aynı oranda %100 izopropanol (500 µL) eklendi. Tüpler çalkalandı.
3. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Ardından 10 dakika 12.000 rcm +4°C'de santrifüj yapıldı.

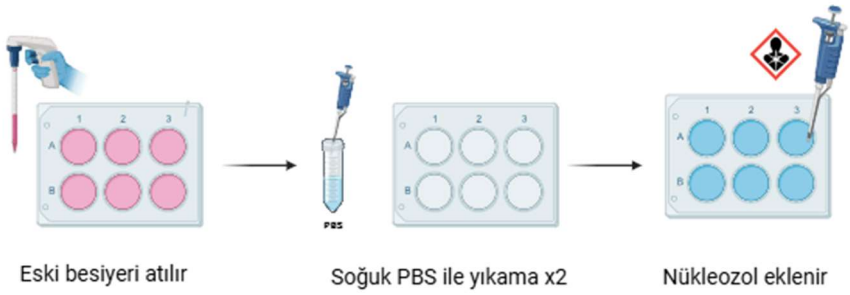
4. Kısım: RNA pelletini yıkama (Şekil 14D)

1. Pellet iki kere %75'lik Etanol ile yıkandı (Önce 2 mL sonra 0,5 mL yeterli).
2. Her etanol uygulamasından sonra 3 dakika 8.000 rcm +4°C'de santrifüj yapıldı.
3. Ardından etanol eklemeden tekrar 1 dakika 8.000 rcm +4°C'de santrifüj yapıldı.
4. 3-4 dakika alkolün uçması beklendi.

Son olarak 20 µL Nuclease-free su ile pellet çözüldü.

Nanodropta 1 µL'de RNA miktarı ve absorbans ölçümü yapıldı.

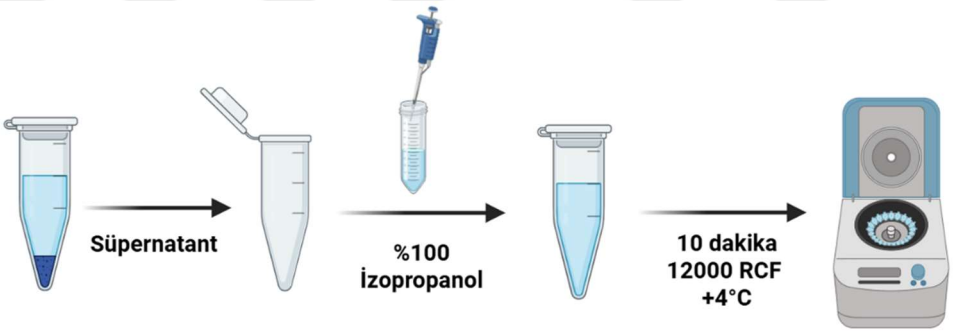
Örnekler daha sonra kullanılmak ve cDNA sentezlemek için -80 °C'de saklandı.



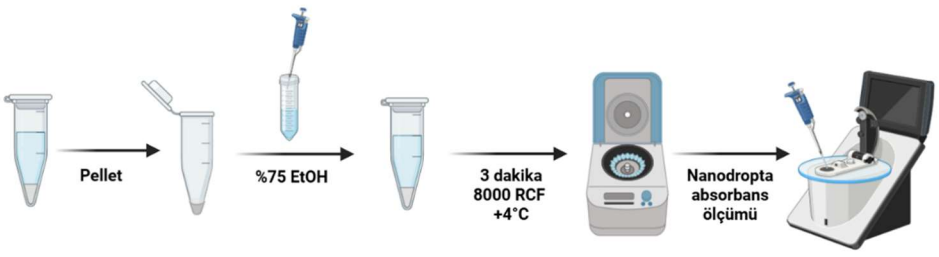
Şekil 14A. Hücre Lizizi



Şekil 14B. Diğer Kontaminantların Presipitasyonu (Çöktürülmesi)



Şekil 14C. Total RNA Presipitasyonu



Şekil 14D. RNA pelletini yıkama

Şekil 14. RNA izolasyonu basamakları (BioRender ile oluşturulmuştur).

3.5.2.9 cDNA Sentezi

İzole edilen ve saflık miktarı ölçülen mRNA'nın komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülmesi ticari kit (Applied Biological Materials Inc, Cat. No. G236) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek gerçekleştirildi. Hacimler deney için gerekli miktara göre uyarlandı. Nanodrop ile ölçümleri yapılan RNA'ların hesaplamaları yapılarak gerekli miktarlar alındı ve üzeri su ile tamamlandı. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde her bir steril PCR tüpüne tablo 7'deki malzemelerden sırasıyla eklendi. Ardından kitin talimatlarına göre ısı döngüsü kullanıldı (Tablo 8) ve komplementer DNA sentezi gerçekleştirildi.

cDNA Sentez Protokolü:

Her örnek için tüpler hazırlandı ve etiketlendi. Buz üzerinde çalışıldı.

Tablo 7. cDNA için hazırlanan karışım

Bileşenler	**Hacim**
5X RT Buffer	4 µL
dNTP	1 µL
Random Primerler	1 µL
Total RNA örneği	1000 ng örnek içerecek şekilde hesaplandı.
Reverse Transkriptaz enzimi	1 µL
Nükleaz-Free dH_2O	20 µL'ye tamamlandı.

Tablo 8. cDNA sentezi için dereceler ve süreler

Thermal Cycler Döngüsü	
Derece	**Süre**
50-55 °C	15 dakika
85 °C	5 dakika
+4 °C	∞
- 20 °C	Uzun süre saklanır.

3.5.2.10 RT-qPCR ile Gen Ekspresyon Analizi

Ticari PCR kiti (Applied Biological Materials Inc, Cat. No. G891) ile RT-qPCR yöntemi kullanılarak *PPAR-γ*, *C/EBPα*, *SREBF1* ve *FASN* genlerinin gen ifadesi çalışıldı. Housekeeping gen olarak *GAPDH* kullanıldı. Reaksiyonda analiz edilecek genlere özgü primerler NCBI Blast ile tasarlandı. Öncelikle primerlerin 100 µM'lık ana stoğu ve 1:10 dilüsyonlu ara stoğu (10 µM) hazırlandı. Ana ve ara stoklar -20°C'de saklandı. PCR reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra 96 kuyulu plaklara yüklendi ve Roche LightCycler 480 cihazında analiz gerçekleştirildi. Sıcaklık, dakika ve döngü sayısı ön deneyler ile belirlenerek analiz yapıldı. RT-qPCR deneyi öncesi Gradiyent PCR ve Konvansiyonel PCR analizleri yapılarak primerlerin melting temperature (Tm) dereceleri kontrol edildi. Her bir reaksiyondan elde edilen Ct değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemine göre analiz edildi (57).

Tablo 9. RT-qPCR için primer diziler

Gen	Forward primer dizi 5'-3'	Reverse primer dizi 5'-3'
PPAR-gamma	TCAGCTCTGTGGACCTCTCC	ACCCTTGCATCCTTCACAAG
C/EBP-alfa	CAAGAACAGCAACGAGTACCG	GTCACTGGTCAACTCCAGCAC
SREBF1	CGACTACATCCGCTTCTTGCAG	CCTCCATAGACACATCTGTGCC
FASN	CACAGTGCTCAAAGGACATGCC	CACCAGGTGTAGTGCCTTCCTC
GAPDH	TCCCACTCTTCCACCTTC	CTGTAGCCGTATTCATTGTC

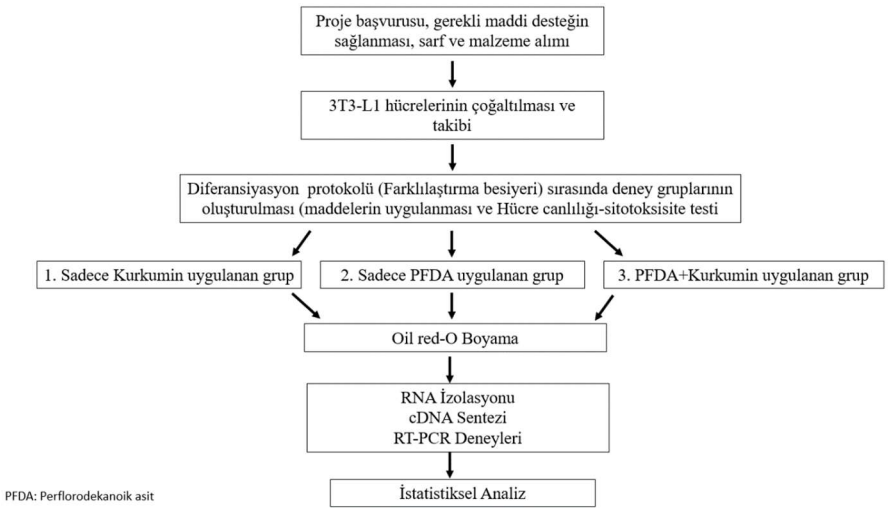
Tablo 10. RT-qPCR için hazırlanan karışım

Bileşenler	**Hacim**
Forward Primer 10 µM	0,5 µL
Reverse Primer 10 µM	0,5 µL
Komplementer cDNA örneği	100 ng örnek içerecek şekilde hesaplandı.
BlasTaq 2X qPCR MasterMix	10 µL
Nükleaz-Free dH_2O	20 µL'ye tamamlandı.

PPARγ ve *C/EBPα* için 60°C, *SREBF1* ve *FASN* genleri için 63°C bağlanma sıcaklığı ayarlandı. Hacimler deney için gerekli miktara göre uyarlandı.

3.6 Araştırma Planı

Ekim 2023	Etik kurul onayı
Ekim-Kasım 2023	Tez önerisinin hazırlanması ve kabulü
Aralık 2023	Proje önerisinin hazırlanması
Ocak 2024-Temmuz 2024	Projenin kabul edilmesi Malzeme alımları
Şubat 2024-Mart 2025	Hücre Kültürü Çalışmaları, Hücrelerin çözülmesi ve çoğaltılması, farklılaşma süreci
Nisan 2024-Aralık 2024	Perflorodekanoik asit (PFDA) ve Kurkumin konsantrasyonlarının uygulamaları ve Hücre canlılığı (sitotoksisite) testleri
Nisan 2024-Ekim 2024	Oil Red-O Boyama
Aralık 2024-Mart 2025	RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)
Şubat 2024-Mayıs 2025	Bulguların değerlendirilmesi ve istatistiksel analizleri
Eylül 2024-Haziran 2025	Tez yazım aşaması



Şekil 15. İş-akış şeması.

3.7 Verilerin Değerlendirilmesi

Bulgular önce Excel'e girildikten sonra elde edilen veriler gruplar arasında istatistiksel belirginliği ortaya çıkarmak için GraphPad Prism 10 yazılımı kullanılarak tek yönlü ANOVA ile hesaplandı. Deney gruplarının aralarındaki çoklu karşılaştırmalar Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Her bir deney için veriler üç tekrar halinde gerçekleştirilen üç bağımsız deneyden elde edildi. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ * ile, $p<0,01$ ** ile, $p<0,001$ *** ile ve $p<0,0001$ **** ile gösterilmiştir.

3.8 Araştırmanın Sınırlılıkları

In vitro ve iki boyutlu hücre kültürü çalışması olması nedeniyle vücut sistemini tam olarak taklit edemeyen bir çalışmadır. Bu çalışmanın devamında yapılacak *in vivo* deney hayvanı veya ko-kültür çalışmaları bulgularımızı destekleyebilir. Bütçe yetersizlikleri sebebiye Western Blot çalışması yapılamamış ve araştırılan genlerin protein düzeyindeki sonuçlarına ulaşılamamıştır. AMPK'nin kinaz aktivitesi ölçümü ELISA yöntemiyle bütçe yeterli olsaydı yapılabilecek testlerdendi. 3T3-L1 hücreleri farklı konsantrasyonlarda kontrol siRNA veya *AMPKα1* siRNA ile transfekte edilerek kurkumin ve PFDA ile *AMPK*'nın *SREBP-1c*'nin indüklenen fosforilasyonunda lipogenezle ilişkili gen ifadesinin aşağı düzenlenip düzenlenmediği ve hücre içi yağ birikiminin azalmasına yol açıp açmadığı incelenebilirdi. Araştırmada Oil Red-O boyama sonrası görüntü alabilmek için ve kısıtlı olan malzemeyi etkili kullanmak için 6 well, 12 well plakalarında kültüre edilen hücrelerde uzun hücre kültürü süresi kaynaklı kontak inhibisyon, hücrelerin kültür kabı kenar bölgelerinde kalkmalarına neden olmuştur ve bu boyanma aşamasını sınırlandırmış deneylerin çok sayıda tekrarlanmasına neden olmuştur. Bu nedenle Oil Red-O boyamalarda sınırlılık yaratmıştır. T25 flasklarda yapılan çalışmalarda daha başarılı sonuç alınmıştır ve özellikler RNA izolasyonu için çalışmalar T25 flasklarda yapılmıştır.

3.9 Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 25.10.2023 tarih, 8404-GOA protokol numarası ve 2023/34-10 no'lu kararında etik açıdan onaylanmıştır (Ek-1).

4. BULGULAR

4.1 Kurkumin ve PFDA'nın Sitotoksisite Testi Bulguları

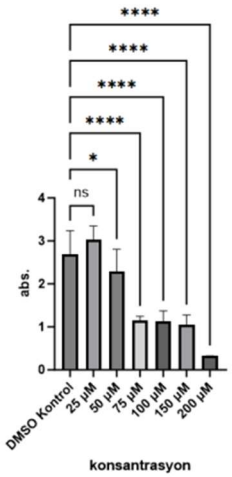
Kurkumin ve PFDA'nın 3T3-L1'in proliferasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak için, hücreler 48 saat boyunca farklı dozların varlığında kültüre edilmiş ve ardından proliferasyon oranları WST-1 testi ile ölçülmüştür.

4.1.1 Kurkuminin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 ile Belirlenmesi

48 saat inkübasyon sürelerinde sadece DMSO-Kontrol besiyeri ile muamele edilen kontrol hücreleriyle kıyaslandığında, düşük doz (25 µM) kurkuminin hücre sitotoksisitesi üzerinde hiçbir etkisi olmadığı görülmüştür. Ancak yüksek dozda (50 µM ve üzerinde) canlılık oranında önemli bir düşüş gözlenmiştir (Tablo 11). Ayrıca, kurkuminin 50 µM ve üzeri dozlarında mikroskobik incelemeler sırasında anormal hücre morfolojisi ve belirgin hücre ölümü gözlenmiştir ($p<0,0001$) (Şekil 16, 17).

Tablo 11. Kurkuminin konsantrasyonlara göre canlılık yüzdeliği

Konsantrasyon	abs	abs	abs	abs	abs	ort. abs	%Canlılık
DMSO Kontrol	3,686	2,774	3,263	3,475	2,846	3,2088	100
25 µM	3,507	3,044	3,419	3,367	3,129	3,2932	102,6303
50 µM	2,651	1,666	2,359	1,643	1,751	2,014	62,7649
75 µM	1,193	1,079	1,08	1,05	1,19	1,1184	34,85415
100 µM	1,187	1,125	1,167	1,233	1,137	1,1698	36,456
150 µM	0,933	0,556	0,852	0,839	1,058	0,8476	26,41486
200 µM	0,334	0,322	0,321	0,313	0,31	0,32	9,972575

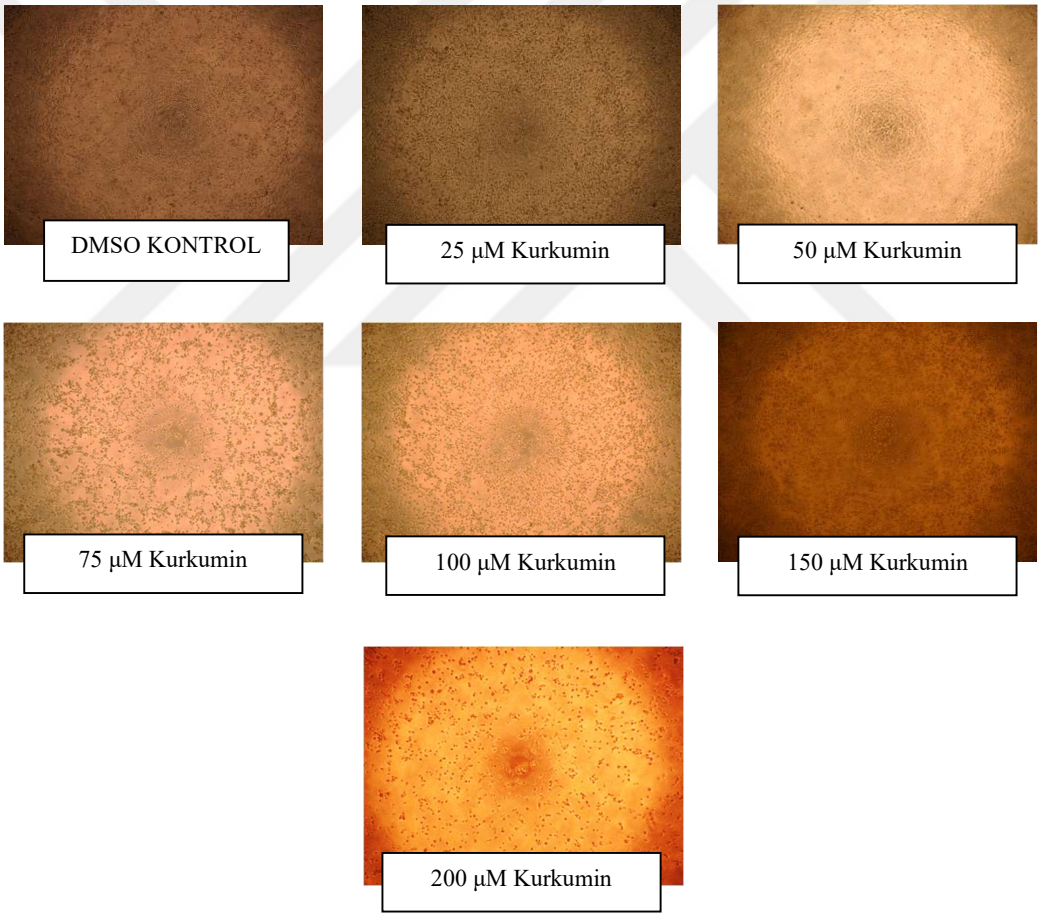


Şekil 16. Kurkumin ile 48 saat inkübe 3T3-L1 hücrelerinin ortalama absorbans grafiği.

Grafik ve hesaplamalara göre:

IC_{50} = 56.15 µM

Bu sonuçlar, Kurkumin'in 3T3-L1 hücrelerinde hücre canlılığını düşürme etkisinin 50–60 µM aralığında belirginleştiğini göstermektedir. Yaptığımız deneylerde gözlemlediğimiz sonuçlar da bize 40 µM'ın üzerinde çıktığımızda hücrelerin yüzeyden sıyrılması veya apoptoza gitmesi gibi görüntüler vermektedir. Bu sebeple etkili olduğunu gördüğümüz bir düşük doz 20 µM ve bir yüksek doz 30 µM kurkumin konsantrasyonları kullanılmıştır.



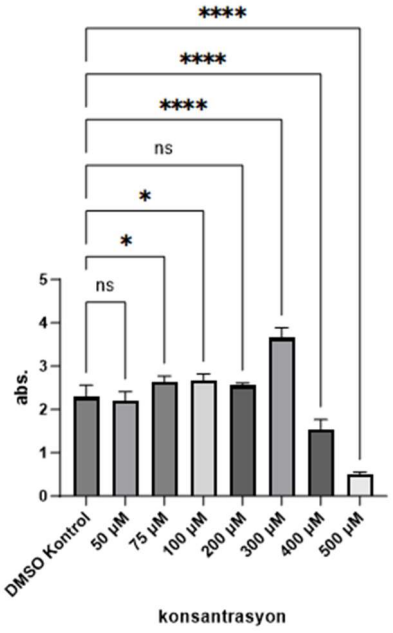
Şekil 17. 96 kuyulu plaka-48 saatlik kurkumin inkübasyonu sonrası ve WST-1 solüsyonu öncesi 4X görüntüleri.

4.1.2 PFDA'nın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 ile Belirlenmesi

48 saat inkübasyon sürelerinde DMSO-Kontrol grubu hücreleriyle kıyaslandığında, 50 µM ile 300 µM aralığında PFDA'nın hücre çoğalması üzerinde anlamlı etkisi olmamıştır. Fakat 400 µM ve üzeri dozlarda canlılığı azaltmaya başlamış olup 500 µM hücre çoğalmasını bariz bir şekilde azaltmıştır ($p<0,0001$) (Şekil 18, 19) (Tablo 12).

Tablo 12. PFDA'nın konsantrasyonlara göre canlılık yüzdeliği

Konsantrasyon	abs	abs	abs	abs	abs	ort. abs	%Canlılık
DMSO Kontrol	2,749	2,289	2,13	2,029	2,222	2,2838	100
50 µM	2,114	2,239	1,954	2,201	2,516	2,2048	96,54085
75 µM	2,728	2,44	2,709	2,512	2,763	2,6304	115,1765
100 µM	2,92	2,595	2,652	2,485	2,65	2,6604	116,4901
200 µM	2,628	2,496	2,593	2,555	2,493	2,553	111,7874
300 µM	3,868	3,834	3,293	3,595	3,689	3,6558	160,0753
400 µM	1,897	1,349	1,364	1,57	1,558	1,5476	67,76425
500 µM	0,587	0,518	0,445	0,464	0,467	0,4962	21,72695

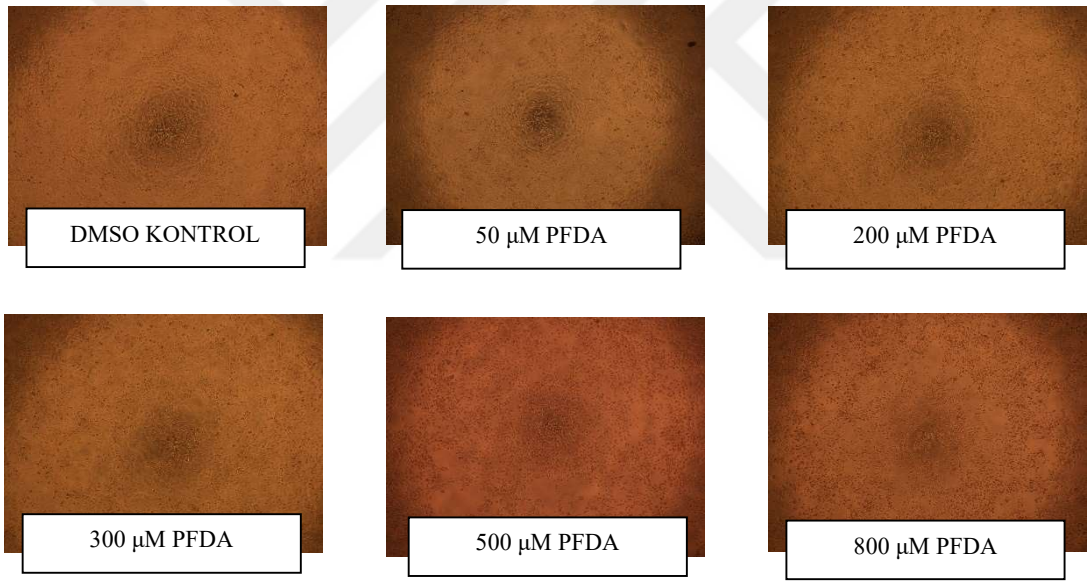


Şekil 18. PFDA ile 48 saat inkübe 3T3-L1 hücrelerinin ortalama absorbans grafiği.

Grafik ve hesaplamalara göre:

IC_{50} = 418.20 µM

96 kuyulu plakada yapılan WST-1 testine göre PFDA 400 µM'a kadar sitotoksik etki göstermemiştir. Fakat 200 µM ve üzeri konsantrasyonlar 6 kuyulu plakalarda denenmiş olup hücre ölümünü ve hücrelerin plaka yüzeylerinden sıyrılıp kalkmasını tetiklediği için etkili olan 50 µM ve 75 µM dozlarıyla çalışmalarımıza devam edilmiştir.



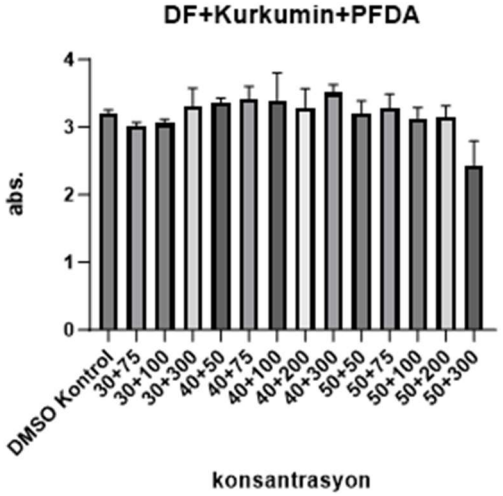
Şekil 19. 96 kuyulu plaka-48 saatlik PFDA inkübasyonu sonrası ve WST-1 solüsyonu öncesi 4X görüntüleri.

4.1.3 Kurkumin ve PFDA Kombinasyonunun Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin WST-1 ile Belirlenmesi

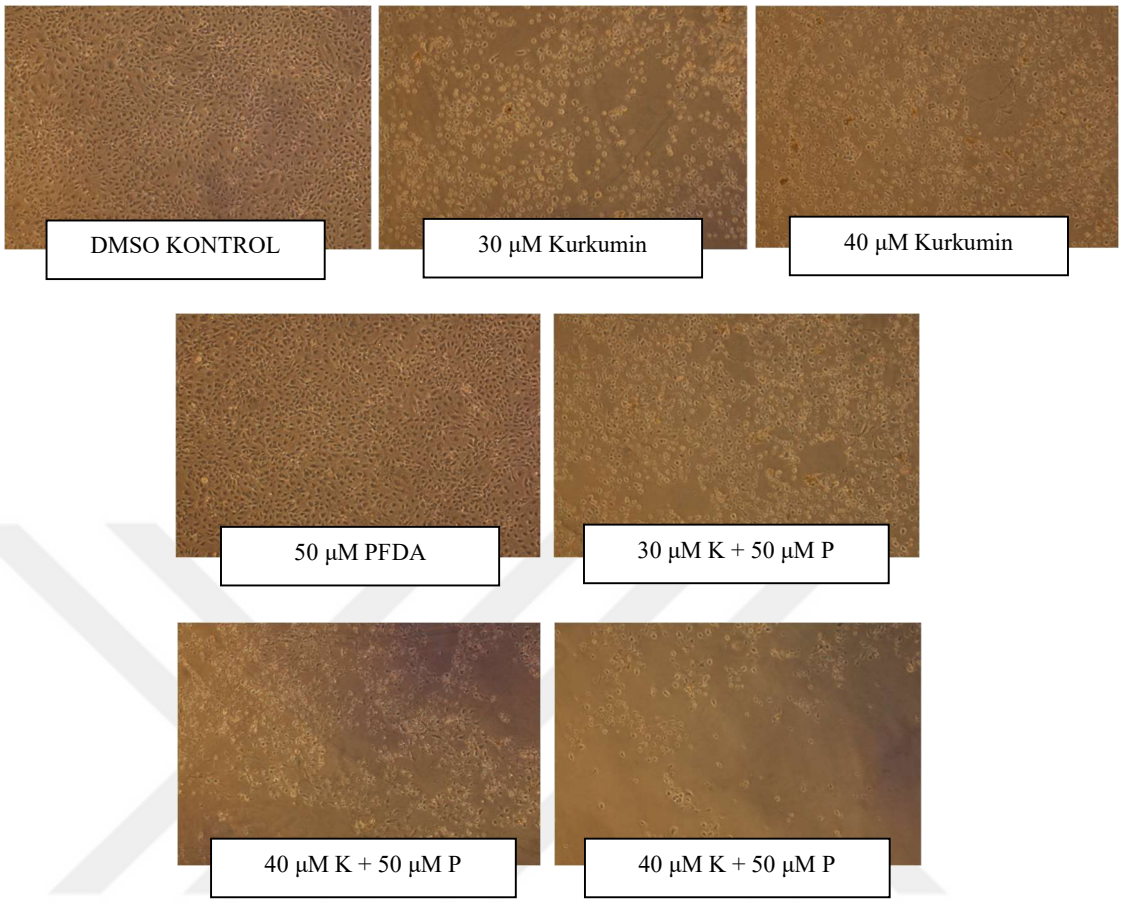
48 saat inkübasyon sürelerinde DMSO-Kontrol grubu ile kombinasyon deney grubu hücreleri kıyaslanmıştır. Kombinasyon halinde düşük dozlardan yüksek dozlara doğru çalışmalar yapılmıştır, konsantrasyon belirlemede esas alınan çalışmalar sunulmuştur (Tablo 13).

Tablo 13. Kurkumin+PFDA'nın konsantrasyonlara göre canlılık yüzdeliği
(önce yazılan doz her zaman kurkumin + sonra yazılan doz her zaman PFDA)

Konsantrasyon (µM)	abs	abs	abs	ort. abs	% Canlılık
DMSO Kontrol	3,152	3,21	3,251	3,204333	100
30+75	2,955	3,068	3,022	3,015	94,09133
30+100	3,126	3,032	3,007	3,055	95,33964
30+300	3,613	3,112	3,216	3,313667	103,412
40+50	3,408	3,391	3,285	3,361333	104,8996
40+75	3,628	3,348	3,254	3,41	106,4184
40+100	3,841	3,307	3,046	3,398	106,0439
40+200	3,37	3,519	2,966	3,285	102,5174
40+300	3,616	3,374	3,534	3,508	109,4768
50+50	3,347	2,995	3,274	3,205333	100,0312
50+75	3,45	3,349	3,049	3,282667	102,4446
50+100	3,296	3,126	2,974	3,132	97,74264
50+200	3,219	2,958	3,269	3,148667	98,26277
50+300	2,163	2,308	2,842	2,437667	76,07407



Şekil 20. Kurkumin+PFDA kombinasyonunun konsantrasyonlara göre ortalama absorbans grafiği.



Şekil 21. Kurkumin+PFDA kombinasyonunun 6 kuyulu plakalarda bazı konsantrasyonlardaki 48 saatlik hücre görüntüsü (4X).

40 µM Kurkumin + 50 µM PFDA ve üzeri kombinasyon dozların 6 kuyulu plakalarda mikroskobik incelemeler sırasında anormal hücre morfolojisi ve belirgin hücre ölümü gözlenmiştir (Şekil 21). Bu sebeple çalışmalar bu dozun altındaki konsantrasyonlarda yapılmıştır.

4.2 IC_{50} Değeri

48 saatlik kurkumin (25, 50, 75, 100, 150, 200 µM) ve PFDA (50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 µM) artan konsantrasyonları uygulaması sonucunda hücre canlılığının %50 oranda azaldığı IC50 dozu kurkumin için 56,15 µM ve PFDA için 418.20 µM olarak hesaplanmıştır.

Tablo 14. 3T3-L1 adiposit hücresi için uygulanan maddelerin IC50 değerleri

MADDE	**3T3-L1 Adiposit**
Kurkumin IC_{50}	56.15 µM
PFDA IC_{50}	418,20 µM

4.3 Kurkumin ve PFDA Kombinasyonun Kombinasyon İndeks (CI) Değerlerinin Belirlenmesi

Kurkumin ve PFDA'nın farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonlarının uygulandığı hücrelere 48 saat inkübasyondan sonra WST-1 testi yapıldı. Yapılan ön deneyler ve analizler sonucunda, 20 µM Kurkumin + 50 µM PFDA, 20 µM Kurkumin + 75 µM PFDA, 30 µM Kurkumin + 50 µM PFDA ve 30 µM Kurkumin + 75 µM PFDA kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir toksisiteye yol açmadığı gözlemlendi.

% inhibisyon değerleri belirlenerek Chou-Talalay metoduna göre CompuSyn veritabanı ile grupların CI değerleri hesaplandı. CompuSyn analizine göre tüm kurkumin ve PFDA kombinasyonları antagonistik etki göstermiştir (CI>1). Kurkumin+PFDA birlikte verildiğinde, tek başlarına oluşturdukları etkiden daha az bir etki yaratıyorlar. CI>1 değerleri, kurkumin ve PFDA'nın kombinasyon halinde hücre canlılığını baskılamada karşılıklı olarak etkilerini zayıflattığını ve beklenenin altında inhibisyon oluşturduğunu göstermektedir.

Tablo 15. Deney grupları için seçilen dozlar ve % canlılık oranları

Konsantrasyon	**Ortalama abs.**	**%Canlılık**
DMSO Kontrol	0,431	100,00
20 µM Kurkumin	0,392	90,95
30 µM Kurkumin	0,369	85,61
50 µM PFDA	0,45	104,41
75 µM PFDA	0,431	100,00
20 µM Kurkumin + 50 µM PFDA	0,434	100,70
20 µM Kurkumin + 75 µM PFDA	0,412	95,59
30 µM Kurkumin + 50 µM PFDA	0,399	92,58
30 µM Kurkumin + 75 µM PFDA	0,38	88,17

Tablo 16. Kurkumin ve PFDA kombinasyonunun uygulandığı 3T3-L1 hücrelerine ait % inhibisyon ve CI değerleri

Kombinasyon	% İnhibisyon	CI Değeri
20 µM Kurkumin – 50 µM PFDA	-0,70 Canlılık oranı %100'den fazla	~1,94 Antagonistik
20 µM Kurkumin – 75 µM PFDA	4,41	~1,998 Antagonistik
30 µM Kurkumin – 50 µM PFDA	7,42	~2,05 Antagonistik
30 µM Kurkumin – 75 µM PFDA	11,83	~2,105 Antagonistik

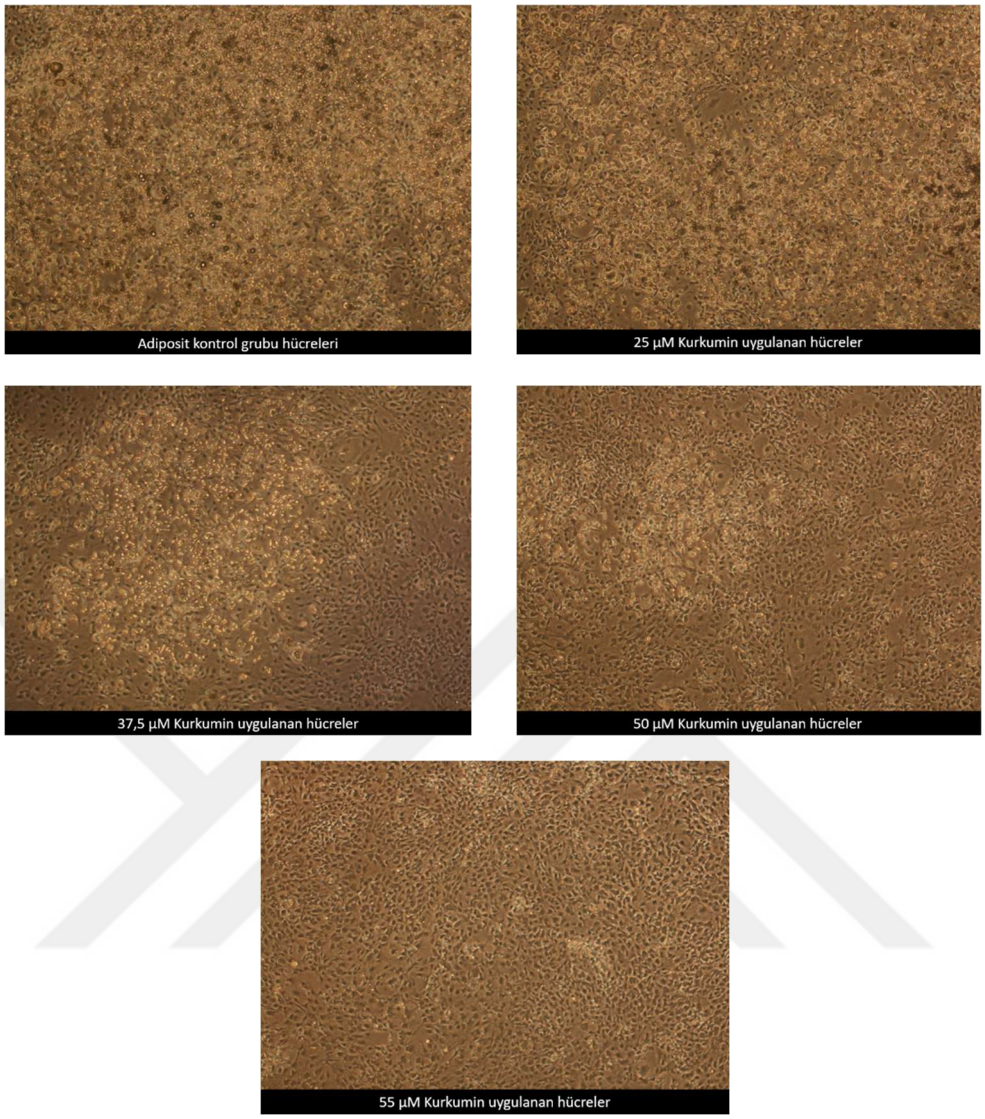
20/50 kombinasyonunda % canlılık 100'ün üstünde çıktığı için inhibisyon negatif gözlendi. Bu, hücrelerin çoğalabileceğini veya reaktif bir cevap verebileceğini gösterebilir.

4.4 Oil Red-O Boyama

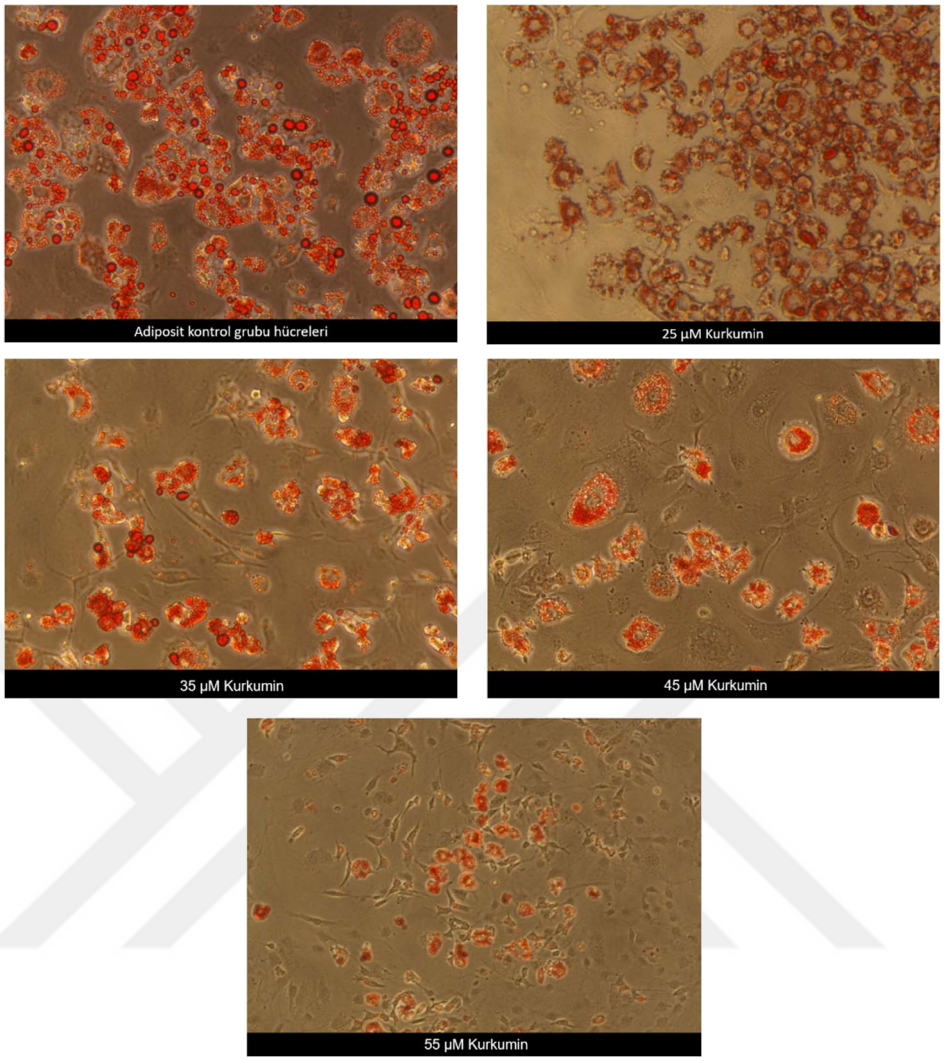
3T3-L1 hücrelerinin lipojenik kapasitesi adipogenezin son gününde (8. gün) Oil Red-O boyamasıyla mikroskobik olarak görüntülenmiş ve görüntüleme sonrası boyanın boyadığı lipitlerin miktar analizi için kuyulara %100 izopropanol eklenmiş ve lipitlere bağlanan boya ayrılmıştır. Beş dakika sonra spektrofotometre ile 510 nm'de kantitatif olarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Verilere bütünsel bakıldığında, kurkuminin PFDA üzerine etkisi, özellikle lipit birikimi bağlamında baskılayıcı yönde olmuştur. Ancak bu etkinin düzeyi PFDA'nın ve kombinasyondaki kurkumin dozuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir.

4.4.1 Kurkumin'in Hücre İçi Lipit Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

Farklılaştırmanın son günü Oil Red-O boyama öncesi görüntüleri şekil 22'de gösterilmektedir. Parıltılar lipit birikimini göstermektedir. 3T3-L1 hücrelerinin lipojenik kapasitesi adipogenezin 8. gününde Oil Red-O boyaması ile mikroskobik olarak görüntülenmiş ve doza bağlı bir azalış gözlenmiştir (Şekil 23). Kontrol grubunda en yüksek absorbans değeri gözlenmiş ve bu durum hücrelerin en fazla lipit birikimi yaptığı durumu temsil etmiştir (Şekil 24, Tablo 17). Kurkumin uygulaması doza bağlı olarak lipit birikiminde anlamlı bir azalmaya yol açmıştır. Bu durum, kurkuminin adipogenez üzerine inhibitör etkisini desteklemektedir ($p<0,0001$).



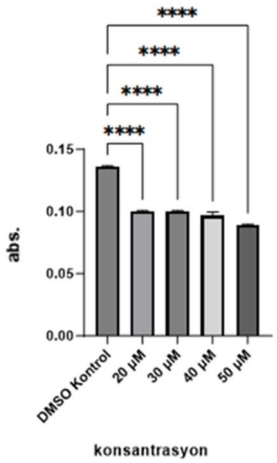
Şekil 22. Kurkumin uygulaması sonrası farklılaştırmanın son günü (4X). (Oil Red-O boyama öncesi-parıltılar lipit tanecikleri).



Şekil 23. Kurkumin uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin boyama sonrası lipit görüntüsü (20X).

Tablo 17. Boyama sonrası spektrofotometrik ölçüm sonuçları (Kurkumin)

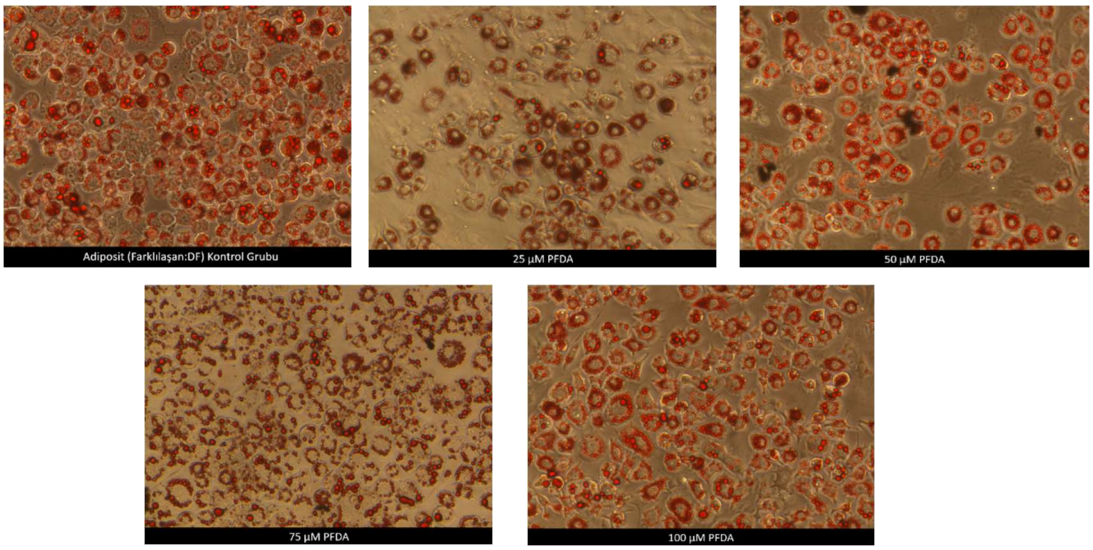
Farklılaştırma ve doz	**Ort. Absorbans**
	510 nm
50 µM Kurkumin	0.091
40 µM Kurkumin	0.097
30 µM Kurkumin	0.105
20 µM Kurkumin	0.105
DMSO-Kontrol	0.143



Şekil 24. Kurkumin uygulanan hücrelerde lipit birikiminin kantitatif ölçümü.

4.4.2 PFDA'nın Hücre İçi Lipit Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

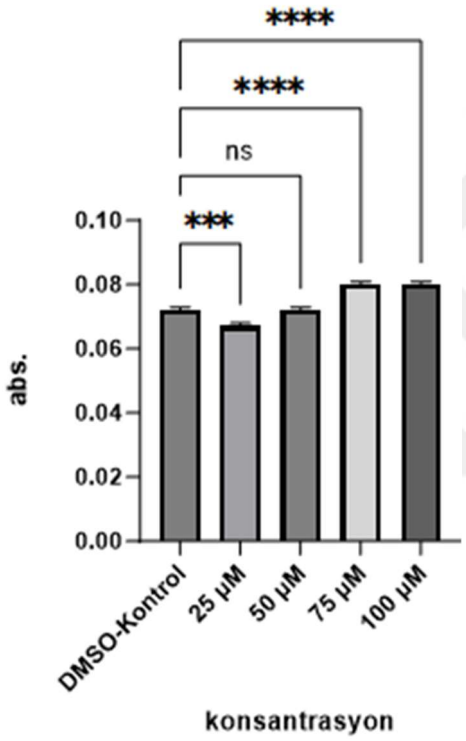
3T3-L1 hücrelerinin lipojenik kapasitesi adipogenezin son gününde Oil Red-O boyaması mikroskobik olarak görüntülenmiş ve düşük dozlarda (25–50 µM) PFDA uygulamasının lipit birikimini kontrol grubuna kıyasla arttırmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, 75 µM ve 100 µM PFDA dozlarının DMSO kontrolden daha yüksek değerler verdiği görülmüştür. Bu, PFDA'nın lipit birikimini artırıcı (adipojenik) potansiyeli olabileceği hipotezini desteklemiştir ($p<0,0001$) (Şekil 25, 26).



Şekil 25. PFDA uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin boyama sonrası lipit görüntüsü (20X).

Tablo 18. Boyama sonrası spektrofotometrik ölçüm sonuçları (PFDA)

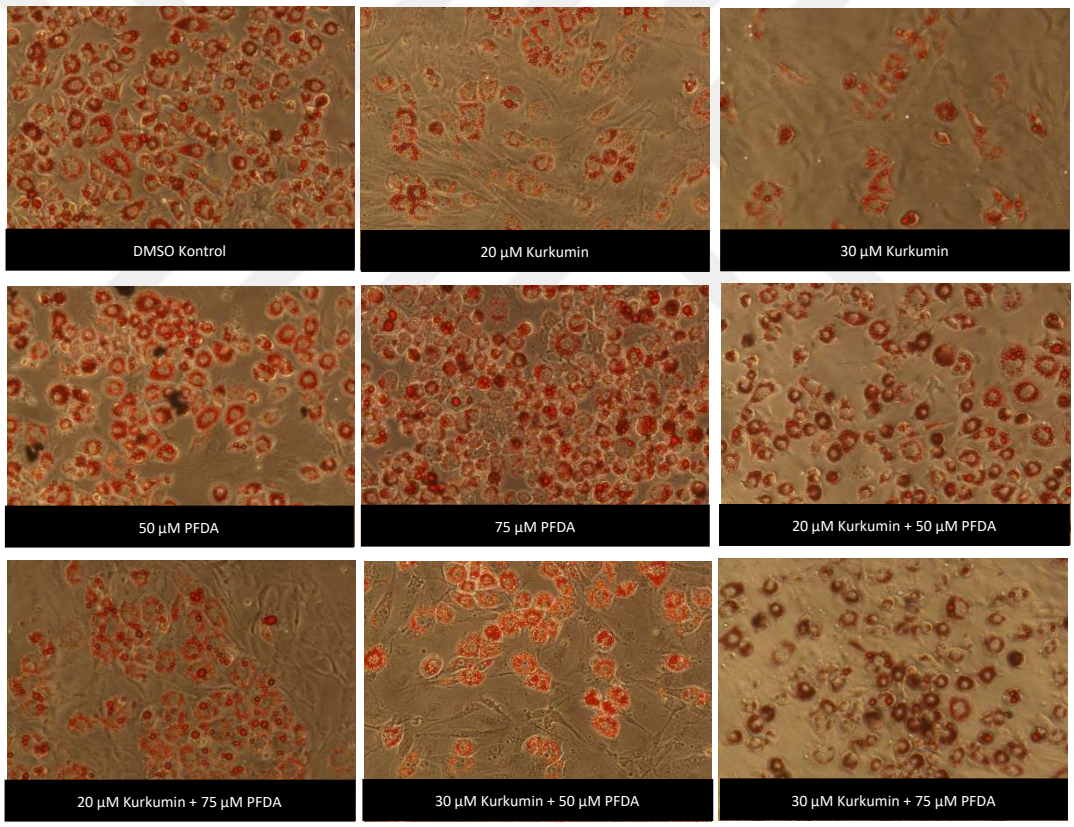
Farklılaştırma ve doz	**Ort. Absorbans**
	510 nm
DMSO-Kontrol	0.072
25 µM PFDA	0.067
50 µM PFDA	0.072
75 µM PFDA	0.08
100 µM PFDA	0.08



Şekil 26. PFDA uygulanan hücrelerde lipit birikiminin kantitatif ölçümü.

4.4.3 Kurkumin ve PFDA'nın Hücre İçi Lipit Birikimine Etkisinin Belirlenmesi

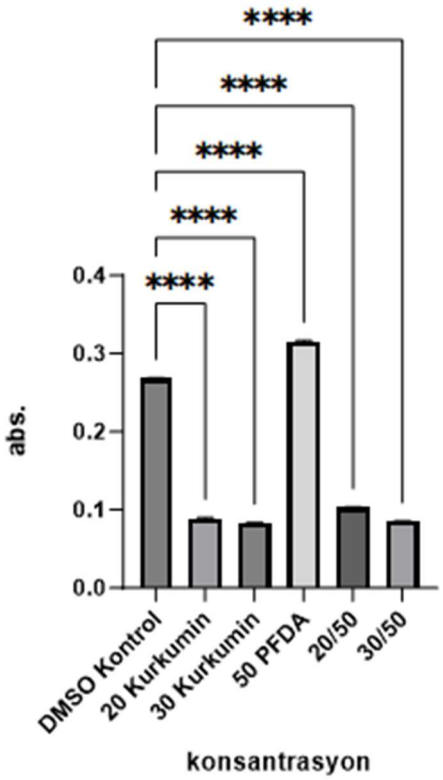
Kurkumin + PFDA kombinasyonlarında, kurkuminin tek başına gösterdiği baskılayıcı etkide hafif bir azalma gözlenmiştir. Bu durum, PFDA'nın adipogenez üzerindeki arttırıcı etkisi ile birlikte lipit artışı olması ve PFDA ile artmış etki üzerinden kurkuminin bu artışı baskılama sürecinin devreye girmesi şeklinde yorumlanabilir. Kombinasyon gruplarında etki sinerjistik değil, daha çok antagonistik seyretmiştir. Kurkumin, PFDA ile birlikte verildiğinde, PFDA'nın tek başına oluşturduğu lipit birikimi değerlerini düşürmeyi başarmıştır ($p<0,0001$).



Şekil 27. Farklı dozlarda kurkumin+PFDA uygulanan hücrelerin 8. gün lipit görüntüsü (20X).

Tablo 19. Boyama sonrası spektrofotometrik ölçüm sonuçları (Kombinasyon)

Farklılaştırma ve doz	**Ort. Absorbans**
	510 nm
DMSO-Kontrol	0.268
20 Kurkumin	0.089
30 Kurkumin	0.083
50 µM PFDA	0.316
20/50	0.103
30/50	0,085



Şekil 28. Kurkumin+PFDA uygulanan hücrelerde lipit birikiminin kantitatif ölçümü.

4.5 RNA İzolasyonu

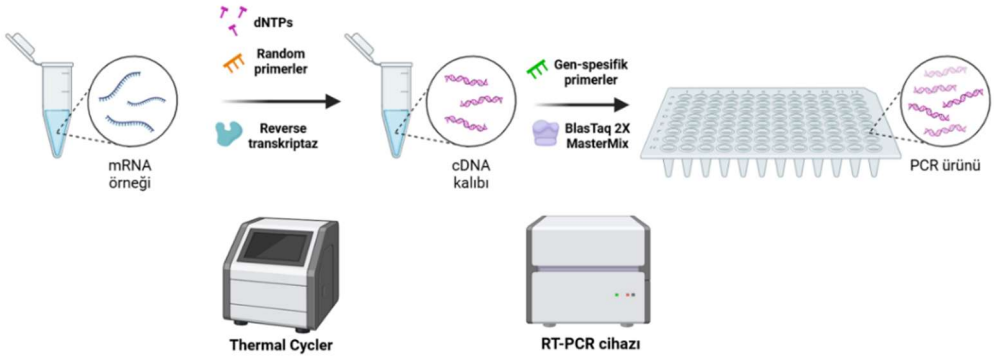
20 µL DNase free su ile çözülen pelletin nanodropta 1 µL'de RNA miktarı ve absorbans ölçümü yapılmıştır.

Tablo 20. Örneklere ait mRNA miktarları

ÖRNEK	**ng/µL miktar**
DMSO-Kontrol	531,92
20 µM Kurkumin	502,28
30 µM Kurkumin	441,16
50 µM PFDA	604,68
75 µM PFDA	773,16
20/50	493,44
20/75	508,20
30/50	504,16
30/75	459,36

4.6 RT-qPCR ile Gen Ekspresyon Analizi

PPARγ, *C/EBPα*, *SREBF1* ve *FASN* gen ekspresyon düzeyleri, Roche LightCycler480 cihazı kullanılarak belirlendi. Housekeeping gen olarak *GAPDH* kullanıldı. *PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBF1* ve *FASN* gen ekspresyon düzeyleri ile *GAPDH* ekspresyonları oranlanarak $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ hesaplandı.

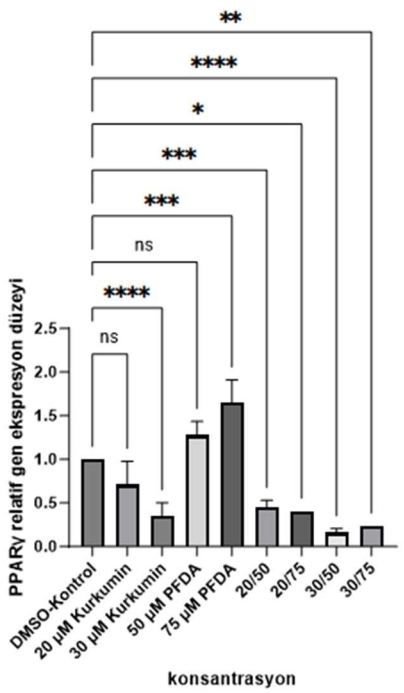


Şekil 29. Örneklerin mRNA izolasyonu ve cDNA sentezini takiben RT-qPCR analizi (BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

mRNA düzeyinde yapılan analizler, *PPARγ* ekspresyonunun 30 µM kurkumin ile anlamlı düzeyde azaldığını, 75 µM PFDA ile arttığını ve kombinasyon gruplarında ise anlamlı şekilde inhibe edildiğini göstermiştir (Kontrol ile karşılaştırıldığında).

Tablo 21. 3T3-L1 örneklerine ait *PPARγ* gen ekspresyon düzeyleri

ÖRNEK	**$2^{-(\Delta\Delta CT)}$ Değişim (Kat)**	**p Değeri**	**Anlam**
DMSO-Kontrol	1		
20 µM Kurkumin	0,710805	0,1484	Anlamlı değil
30 µM Kurkumin	0,357142	<0,0001	Anlamlı azalış ****
50 µM PFDA	1,27745	0,0955	Anlamlı değil
75 µM PFDA	1,6535	0,0004	Anlamlı artış ***
20/50	0,447631	0,0006	Anlamlı azalış ***
20/75	0,407066	0,0105	Anlamlı azalış *
30/50	0,160687	<0,0001	Anlamlı azalış ****
30/75	0,235969	0,0013	Anlamlı azalış **

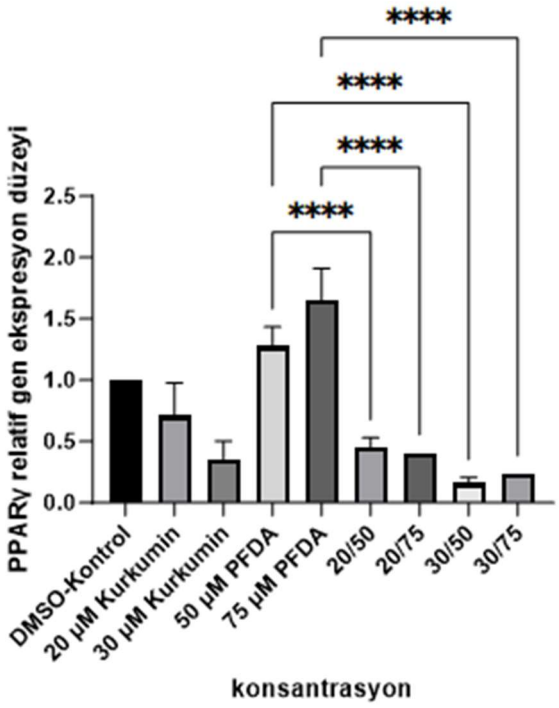


Şekil 30. *PPARγ* relatif gen ekspresyon düzeyleri (kontrole kıyasla).

PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması *PPARγ* gen ekspresyonunda anlamlı bir inhibisyonla sonuçlanmıştır. *PPARγ* geni ortama kurkumin eklenmesiyle inhibe edilmiştir. Kısaca PFDA'nın indüklediği adipogenezi kurkumin baskılamada etkili bulunmuştur.

Tablo 22. *PPARγ* geninde PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması

Karşılaştırma	p Değeri	Anlam
50 µM PFDA ile 20/50	<0,0001	Anlamlı azalış ****
50 µM PFDA ile 30/50	<0,0001	Anlamlı azalış ****
75 µM PFDA ile 20/75	<0,0001	Anlamlı azalış ****
75 µM PFDA ile 30/75	<0,0001	Anlamlı azalış ****

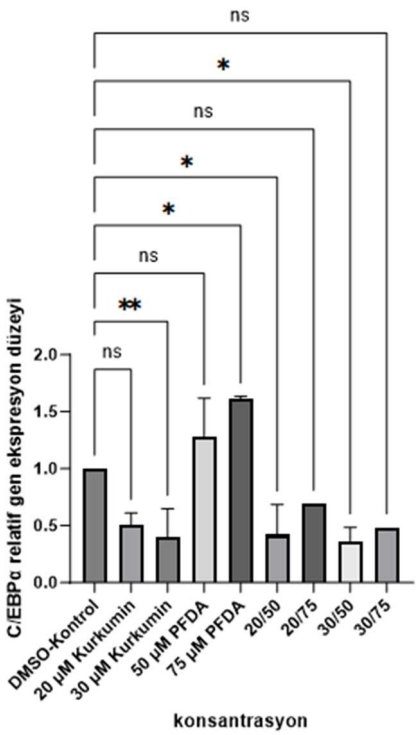


Şekil 31. *PPARγ* relatif gen ekspresyon düzeyleri (gruplar arası karşılaştırma).

mRNA analizlerine göre, *C/EBPα* ekspresyonunda; 30 µM kurkumin ile anlamlı bir azalış, 75 µM PFDA ile anlamlı bir artış, kombinasyon gruplarından ise yalnızca 20/50 ve 30/50 gruplarında anlamlı bir inhibisyon gözlenmiştir (Kontrol ile karşılaştırıldığında).

Tablo 23. 3T3-L1 örneklerine ait *C/EBPα* gen ekspresyon düzeyleri

ÖRNEK	**$2^{-(\Delta\Delta CT)}$ Değişim (Kat)**	**p Değeri**	**Anlam**
DMSO-Kontrol	1		
20 µM Kurkumin	0,506646	0,1002	Anlamlı değil
30 µM Kurkumin	0,39851	0,0093	Anlamlı azalış **
50 µM PFDA	1,28503	0,4367	Anlamlı değil
75 µM PFDA	1,61335	0,0311	Anlamlı artış *
20/50	0,422508	0,0443	Anlamlı azalış *
20/75	0,692555	0,7346	Anlamlı değil
30/50	0,365945	0,0253	Anlamlı azalış *
30/75	0,485205	0,2381	Anlamlı değil

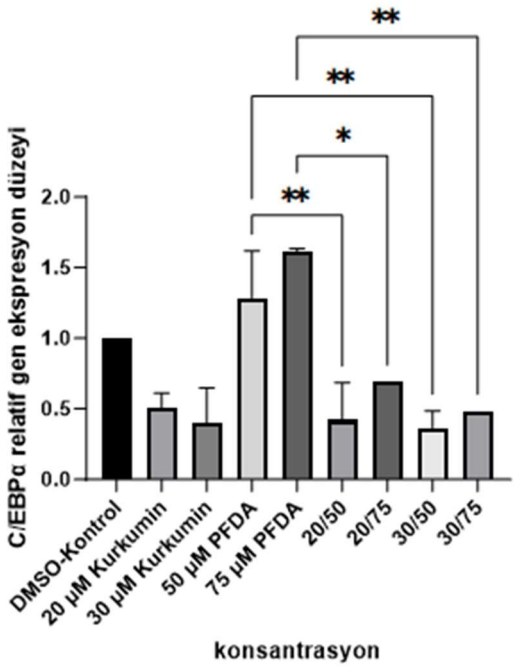


Şekil 32. *C/EBPα* relatif gen ekspresyon düzeyleri (kontrole kıyasla).

PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması *C/EBPα* gen ekspresyonunda anlamlı bir inhibisyonla sonuçlanmıştır. *C/EBPα* geni ortama kurkumin eklenmesiyle inhibe edilmiştir. Kısaca PFDA'nın indüklediği adipogenezi kurkumin baskılamada etkili bulunmuştur.

Tablo 24. *C/EBPα* geninde PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması

Karşılaştırma	p Değeri	Anlam
50 µM PFDA ile 20/50	0,0025	Anlamlı azalış **
50 µM PFDA ile 30/50	0,0015	Anlamlı azalış **
75 µM PFDA ile 20/75	0,0131	Anlamlı azalış *
75 µM PFDA ile 30/75	0,0030	Anlamlı azalış **

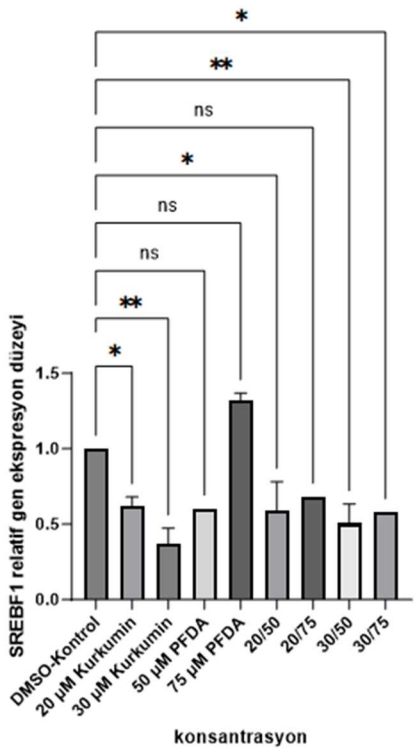


Şekil 33. *C/EBPα* relatif gen ekspresyon düzeyleri (gruplar arası karşılaştırma).

mRNA analizlerine göre, *SREBF1* ekspresyonunda; 20 µM ve 30 µM kurkumin uygulamaları anlamlı bir azalışa neden olurken, PFDA gruplarında anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Kombinasyon gruplarından ise 20/50, 30/50 ve 30/75 gruplarında anlamlı düzeyde inhibisyon tespit edilmiştir (Kontrol ile karşılaştırıldığında).

Tablo 25. 3T3-L1 örneklerine ait *SREBF1* gen ekspresyon düzeyleri

ÖRNEK	**$2^{-(\Delta\Delta CT)}$ Değişim (Kat)**	**p Değeri**	**Anlam**
DMSO-Kontrol	1		
20 µM Kurkumin	0,623692	0,0253	Anlamlı azalış *
30 µM Kurkumin	0,370349	0,0014	Anlamlı azalış **
50 µM PFDA	0,604299	0,0602	Anlamlı değil
75 µM PFDA	1,32448	0,0512	Anlamlı değil
20/50	0,587967	0,0160	Anlamlı azalış *
20/75	0,68302	0,1456	Anlamlı değil
30/50	0,507451	0,0060	Anlamlı azalış **
30/75	0,581023	0,0466	Anlamlı azalış *

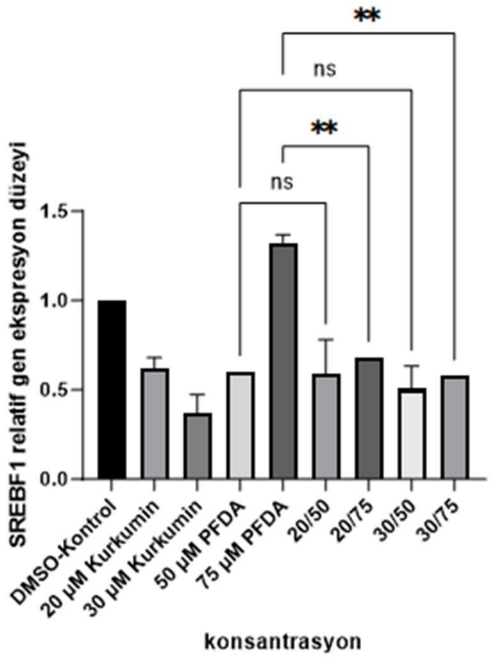


Şekil 34. *SREBF1* relatif gen ekspresyon düzeyleri (kontrole kıyasla).

PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması *SREBF1* geninde 20/50 ve 30/50 anlamlı bir azalışa sebep olmazken 20/75 ve 30/75 anlamlı bir azalışa sebep olmuştur. *SREBF1* geninde 20 µM ve 30 µM kurkumin 50 µM PFDA'yı inhibe edemezken 75 µM PFDA'yı baskılayabilmesi, sebebini anlayamadığımız bir çelişki yaratmıştır. Fakat diğer genlerde böyle bir durumla karşılaşılmadığı için *SREBF1* genine özel bir durum olabilir.

Tablo 26. *SREBF1* geninde PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması

Karşılaştırma	p Değeri	Anlam
50 µM PFDA ile 20/50	0,9999	Anlamlı değil
50 µM PFDA ile 30/50	0,9117	Anlamlı değil
75 µM PFDA ile 20/75	0,0048	Anlamlı azalış **
75 µM PFDA ile 30/75	0,0020	Anlamlı azalış **

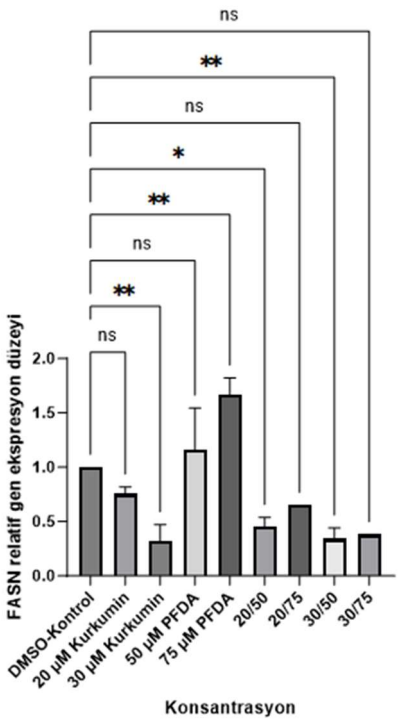


Şekil 35. *SREBF1* relatif gen ekspresyon düzeyleri (gruplar arası karşılaştırma).

mRNA analizlerine göre, *FASN* ekspresyonu 30 µM kurkumin ile anlamlı şekilde azalmış, 75 µM PFDA ile anlamlı düzeyde artmıştır. Kombinasyon gruplarında ise yalnızca 20/50 ve 30/50 gruplarında anlamlı bir inhibisyon gözlenmiştir (Kontrol ile karşılaştırıldığında).

Tablo 27. 3T3-L1 örneklerine ait *FASN* gen ekspresyon düzeyleri

ÖRNEK	**$2^{-(\Delta\Delta CT)}$ Değişim (Kat)**	**p Değeri**	**Anlam**
DMSO-Kontrol	1		
20 µM Kurkumin	0,755726	0,5886	Anlamlı değil
30 µM Kurkumin	0,317235	0,0023	Anlamlı azalış **
50 µM PFDA	1,16355	0,8221	Anlamlı değil
75 µM PFDA	1,66981	0,0071	Anlamlı artış **
20/50	0,457513	0,0130	Anlamlı azalış *
20/75	0,650671	0,4838	Anlamlı değil
30/50	0,342688	0,0082	Anlamlı azalış **
30/75	0,381565	0,0600	Anlamlı değil

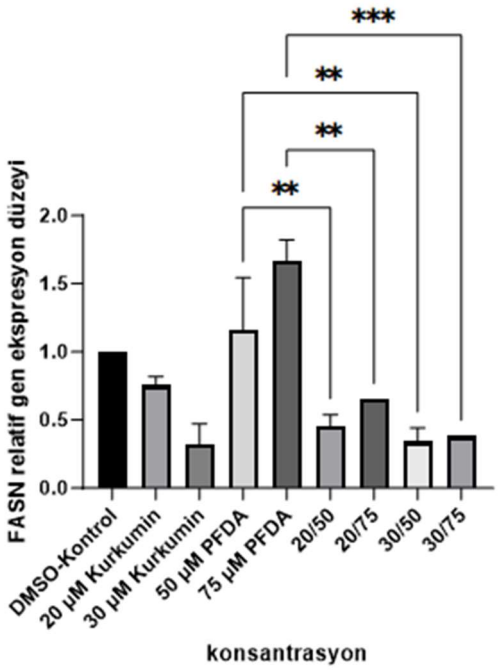


Şekil 36. *FASN* relatif gen ekspresyon düzeyleri (kontrole kıyasla).

PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması *FASN* gen ekspresyonunda anlamlı bir inhibisyonla sonuçlanmıştır. *FASN* geni ortama kurkumin eklenmesiyle inhibe edilmiştir. Kısaca PFDA'nın indüklediği adipogenezi kurkumin baskılamada etkili bulunmuştur.

Tablo 28. *FASN* geninde PFDA ile kurkumin + PFDA kombinasyonunun karşılaştırması

Karşılaştırma	p Değeri	Anlam
50 µM PFDA ile 20/50	0,0018	Anlamlı azalış **
50 µM PFDA ile 30/50	0,0013	Anlamlı azalış **
75 µM PFDA ile 20/75	0,0024	Anlamlı azalış **
75 µM PFDA ile 30/75	0,0003	Anlamlı azalış ***



Şekil 37. *FASN* relatif gen ekspresyon düzeyleri (gruplar arası karşılaştırma).

5. TARTIŞMA

Adipogenez öncül hücre olan preadipositlerin lipit yüklü adipositlere farklılaşmasıyla oluşan sıkı bir şekilde düzenlenmiş hücresel farklılaşma sürecidir. Hücresel farklılaşma çok potansiyelli gen ifadelerinin spesifik gen ifadesine özelleştiği değişiklikler bütünüdür. Bu nedenle, transkripsiyon faktörleri adipogenez için çok önemlidir. Adipogenez, enerji metabolizması ve yağ dokusunun yapısal organizasyonu açısından hayati bir süreçtir. Bu süreçte başlıca rol oynayan transkripsiyon faktörlerinden *PPARγ*, terminal adiposit farklılaşmasının temel düzenleyicisidir. *C/EBPα* ile birlikte *PPARγ*, adipogeneze özgü genlerin ekspresyonunu artırarak yağ hücrelerinin olgunlaşmasını sağlar (12). Aynı zamanda lipogenez sürecinde görev alan *SREBF1* ve *FASN,* yağ asidi sentezinin düzenlenmesinde anahtar konumdadır (36). Tez çalışmamızda, PFDA ve kurkuminin yağ hücreleri üzerindeki olası etkilerini araştırmak amacıyla gen ekspresyon düzeyinde analizler gerçekleştirilmiştir.

Farklılaşmış adipositlerin temel özellikleri büyüme durması, morfolojik değişim ve adipojenik ve lipojenik genlerin yüksek ekspresyonudur. Hücrelerin mitotik klonal genişleme aşamasına ve ardından farklılaşmaya ilerlemesi için uygun indükleyicilere ihtiyaç vardır (58). 3T3-L1 fibroblastları DEX, IBMX ve insülin kullanılarak indüksiyon sonrasında yaklaşık bir haftalık bir süre içerisinde lipit tanecikli adipositlere farklılaşabilmektedir (59, 60). Bu kokteyl, hücrelerdeki adipojenik programı aktive eder ve daha sonra adipogenezin farklı aşamalarına yönlendirilir (19).

Doğal yağ dokusunun davranışını yakından taklit edebilme kabiliyetleri nedeniyle yağ hücresi farklılaşması, metabolik fonksiyonlar ve yağ hücrelerinin obezite ve insülin direncindeki rolü üzerine araştırmalarda çok önemlidir (61). Preadiposit klonal hücre hatları 3T3-L1, 3T3-F442A, TA1, AP-18 ve Ob1771 benzer farklılaşma aşamalarına sahip hücre popülasyonu sunar. Bu preadiposit hücrelerinin süresiz olarak pasaj yapabilme yeteneği, bu hücre hatlarını çalışmalar için etkili bir kaynak olarak sunar. Kapsamlı araştırmalar 3T3-L1 hücrelerinin diğer olgun adiposit hücre hatlarına göre önemli ölçüde daha düşük maliyetlerle en etkili hücreler olduğunu göstermektedir (62). Zhao ve arkadaşları, 3T3-L1 hücrelerinin sıvı nitrojenden tekrar tekrar çözdürülmesi durumunda farklılaşma verimliliğinin düştüğünü öne sürmüştür

(63). Çalışmamızda biz de buna benzer bir sonuca varmaktayız. Ek olarak bu hücre hattı, pasaj durumundan önce konfluensiye ulaşırsa düzgün bir şekilde adipositlere farklılaşamazlar. Bu nedenle, 3T3-L1 hücrelerinin kültürlenmesi zorlu olabilir ve stabil hücre hatlarının oluşturulmasındaki kullanımını sınırlayabilir.

Bisfenol-A (BPA) ve poliklorlu bifeniller (PCB'ler) dahil olmak üzere bazı adipojenik bileşiklerin, 3T3-L1 hücrelerinin kullanıldığı çalışmalarda obezitenin indüklenmesine sebep olduğu gösterilmiştir (62). Bizim çalışmamızda perflorlu bileşiklerden olan PFDA kullanılmıştır. PFDA, uzun yıllardır tencere imalatından halı ve kumaşlara, yangın söndürme köpüklerinden gıda ambalajlarına kadar çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Yüksek performanslı bir uygulama kimyasalı olmasına karşın, toksisitesi oldukça yüksektir ve kalıcı çevre kirleticileri arasında yer almaktadır. Kullanımının artması, çevresel kirlenmenin yanı sıra insan sağlığı açısından da önemli riskleri beraberinde getirmiştir. Bu risklerin başlıca kaynağını, pişirme kapları ve gıda ambalajları oluştururken; içme suyu ve tüketilen gıdalar da ek maruziyet yolları arasında yer almaktadır. Son yıllarda bazı epidemiyolojik çalışmalar, PFC maruziyeti ile obezite arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Bu bileşikler, endokrin sistem üzerinde bozucu etkiler gösterdiği için "endokrin bozucu" sınıfına alınmakta ve hem hayvan hem de insan çalışmalarında obezite ve metabolik bozukluklarla ilişkilendirilmektedir (5). The European Youth Heart Study verileri, PFC'lere maruz kalan 8 ila 10 yaş arası aşırı kilolu çocuklarda, diğer akranlarına kıyasla daha yüksek kan trigliserit düzeylerinin gözlendiğini bildirmiştir (50). PFDA ile yapılan deneysel *in vivo* bir çalışmada ise, erkek C57BL/6J farelerinde hepatik lipit birikiminin arttığı gösterilmiştir (48). Watkins ve arkadaşlarının çalışması bizim çalışmamızla paralel doğrultuda, 3T3-L1 hücrelerinde farklı perflorlu bileşiklerle (PFOA, PFHxS, PFOS, PFNA) yapılan preadipositlerin farklılaşmasını uyarma yeteneğini göstermektedir (64). NIEHS tarafından finanse edilen bir araştırmaya göre, PFAS'a maruz kalmak kilo verme çabalarını olumsuz etkileyebilmektedir (65). Çok sayıda endüstriyel ve tüketici ürününde bulunan PFAS'ın, metabolik değişiklikler ve obezite de dahil olmak üzere çeşitli sağlık sorunlarıyla bağlantılı olduğu belirtiliyor. Araştırmacılar, klinik çalışmanın başlangıcında toplanan katılımcı kan örneklerini beş farklı PFAS açısından analiz etmiş ve ardından başlangıç PFAS konsantrasyonları ile zaman içindeki kilo dalgalanmaları arasındaki ilişkileri

incelemek için istatistiksel yöntemler kullanmışlardır. Katılımcıların hangi diyeti uyguladığına bakılmaksızın, kilo alımı ile kandaki PFAS seviyeleri arasında anlamlı ve pozitif bir ilişki gözlemlemişlerdir. Bulgular, PFAS'ın obezitedeki küresel eğilimin artmasına katkıda bulunabileceğine dair artan kanıtları desteklemektedir (65, 66). PFDA, PFAS sınıfına dahil olan, çevresel kalıcılığı yüksek ve biyolojik sistemlerde birikim eğilimi gösteren sentetik bir bileşiktir. Modaresi ve arkadaşları, içinde PFDA'nın da bulunduğu 10 PFAS çeşidi ile güncel bir çalışma yapmış olup PFDA'nın 3T3-L1 preadiposit hücre hattında adipogenez süreci üzerinde belirgin etkiler oluşturabileceğini ortaya koymaktadır (67). Şimdiye kadar en iyi bilinen ve iyi çalışılmış PFAS'lar perflorooktanoik asit (PFOA) ve perflorooktan sülfonik asittir (PFOS). Bu kimyasalların insan sağlığına, yaban hayatına ve çevreye verdiği zarar konusundaki endişelerin artması nedeniyle, ABD Çevre Koruma Ajansı 2006 yılında PFOA Yönetim Programını başlatmıştır (68).

Gıdayla temas eden ve endokrin sistem üzerinde bozucu etki gösteren ftalatlar üzerinde yapılan diğer araştırmalarda da bu kimyasalların 3T3-L1 hücrelerinde adipogenezi tetiklediği ortaya koyulmuştur (4). Sakuma ve arkadaşları bu etkilerin, adipogenez sürecini inhibe etme potansiyeline sahip doğal bileşiklerden biri olan kurkumin ilavesiyle baskılanabildiği rapor etmiştir (4). Çalışmamızda çoğu çalışmayla paralel sonuçlar bulunmuş olup kurkuminin adiposit farklılaşmasını ve lipit damlacıklarının oluşmasını baskıladığı görülmüştür. Ftalatlar genellikle plastik malzemelerde plastikleştirici olarak kullanılmakta olup; gıda ambalajları, mobilyalar, oyuncaklar ve bazı tıbbi cihazlarda yaygın biçimde bulunmaktadır. Bu maddeler, solunum, sindirim ya da cilt teması yoluyla insan vücuduna alınabilmektedir. Bir endokrin bozucu olan benzil bütil ftalata (BBP) maruz bırakılan 3T3-L1 hücrelerinde trigliserit düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiş; buna karşılık ortama kurkumin eklenmesiyle *PPARγ* ve *C/EBPα* mRNA düzeylerinde azalma kaydedilmiştir (4). Çalışmamızda kullanılan PFDA da benzer şekilde, gıda uygulamalarında kullanılan toksik ve potansiyel olarak zararlı bir kimyasal bileşik olarak dikkat çekmektedir (5).

Kurkuminin hem hücre kültürlerinde hem de hayvan temelli obezite modellerinde adipogenezi baskıladığı çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (1, 4). Yapılan *in vitro* çalışmalar, kurkuminin 3T3-L1 preadipositlerinde adipojenik farklılaşmayı inhibe ettiğini ve bunu, *PPARγ* ve *C/EBPα* yolunu aşağı

yönde regüle ederek gerçekleştirdiğini bildirmiştir (4). Sıçanlarda iki hafta boyunca uygulanan yüksek yağlı diyete kurkumin takviyesi, yağ dokusunun azalmasına ve lipit birikiminin baskılanmasına neden olmuştur (44). Son dönemdeki klinik bulgular ise kurkuminin tip 2 diyabet hastalarında plazma trigliserit düzeylerini düşürebileceğini göstermektedir (4). Wu ve arkadaşlarının çalışması, kurkuminin preadiposit hücrelerde apoptozu tetiklediğini ve bu sayede adiposit farklılaşmasını sınırlayarak adipogenezi zayıflattığını öne sürmektedir (43). Mevcut literatür, çalışmamızın başında kullandığımız yüksek doz kurkuminin hücre ölümünü tetikleyebileceğini destekler niteliktedir. Kim ve arkadaşları, kurkuminin mitotik klonal genişlemenin modülasyonu yoluyla adiposit farklılaşmasını engellediğini gözlemiştir. Fakat kurkuminin bu inhibitör etkisinin büyük ölçüde adiposit farklılaşmasının erken evresiyle sınırlı olduğu görülmüştür (42). Literatürde bildirilen bu sonuca göre çalışmamızda kurkumin, hücrelere erken (0-2. gün) evrede verilmiştir. Ayrıca kurkumin, adiposit farklılaşmasını doza bağlı bir şekilde inhibe edebilmektedir. Ejaz ve arkadaşlarının çalışmasında kültür ortamındaki kurkumin konsantrasyonunun artmasıyla, preadipositlerin olgun adipositlere farklılaşmasında önemli bir inhibisyon ve hücrelerde daha az lipit birikimi gözlemlenmiştir (1). Bulgularımız literatürle uyumlu olup kurkuminin tek başına ve kombinasyon durumundayken adipogenezi baskıladığı yönündedir.

Kurkumin+PFDA kombinasyonu ile yaptığımız çalışmalarda elde edilen bulgular 3T3-L1 hücrelerinde yapılan literatürdeki ilk çalışma olup temel bilgiler sunmaktadır. Öncelikle kurkumin, PFDA ve bu maddelerin kombinasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri WST-1 testi aracılığıyla değerlendirilmiştir.

Tek başına uygulanan kurkumin, doza bağlı olarak hücre canlılığında belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Zhao ve arkadaşlarının çalışmasında 50 μM ve üzeri kurkumin dozları sitotoksik etki göstermiştir (45). Bizim elde ettiğimiz kurkumin WST-1 verileri ile benzerlik göstermektedir (Tablo 11).

Wang ve arkadaşlarının çalışmasında 3T3-L1 hücre hattında PFDA ile yapılan çalışmada 0, 1, 5 ve 10 μM dozlar kullanılmıştır (5). Ancak bizim WST-1 çalışmalarımızda PFDA'nın düşük konsantrasyonlarının (50 μM ve 75 μM) hücre canlılığını fazla etkilemediği ve bu dozlarda antiproliferatif etkisinin sınırlı olduğu

saptanmıştır. Bu durum PFDA'nın düşük dozdayken proliferatif etkiler gösterebileceğine işaret etmiştir. Bu sebeple IC50 bulabilmek için daha yüksek PFDA dozlarının denenmesi tercih edilmiştir (Tablo 12). 500 µM hücrenin canlılığını oldukça fazla etkilemiş ve %21'e düşürmüştür. Bu doz farkının sebebinin literatürdeki maddenin ve bizim kullandığımız maddenin marka farkından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bir diğer sebep ise her ne kadar hücre hattı aynı olsa bile ortam koşulları, pasaj sayısı, besiyeri ve besiyerinde kullanılan diğer içerikler bakımından da değişiklikler gösterebileceği tahmin edilmektedir. Bjork ve Wallace, HepG2/C3A sıçan primer hepatositlerinde perfloroalkil asitler ile yaptıkları çalışmada 100 µM PFDA kullanmışlardır (69). Farklı bir hücre hattı olmasına rağmen sitotoksisite konusunda bizimle benzer sonuç almışlardır.

Kurkumin+PFDA kombinasyonu 96 kuyulu plakadaki WST-1 deneylerinin sonuçlarına göre (Tablo 13) farklı dozların bir araya gelmesiyle oluşturulan kombinasyon gruplarında tekli uygulamalara kıyasla canlılığın çok fazla etkilenmediği tespit edilirken 6 kuyulu plakadaki mikroskop görüntülerinde hücrelerin morfolojilerinin değiştiği ve hücrelerin öldükleri açıkça gözlenmiştir (Şekil 21). Bu sebeple 6 kuyulu plakalarda birçok kez tekrarlayarak yaptığımız konsantrasyon çalışmalarında şekil 21'de gösterildiği üzere hücreleri yüzeyden kaldırıp ölmelerine sebep olduğu için yüksek kombinasyon dozlarının kullanamayacağımız dozlar olduğu düşünülmüştür. Yüzey alanının genişliğinden olduğunu düşündüğümüz bu sebeple WST-1 sonuçlarımıza göre değil, 6 kuyulu plaka üzerindeki deneylerin sonuçlarına göre doz belirlemenin daha doğru olacağına karar verilmiştir. Çalışmalarımız 20 µM Kurkumin + 50 µM PFDA, 20 µM Kurkumin + 75 µM PFDA, 30 µM Kurkumin + 50 µM PFDA ve 30 µM Kurkumin + 75 µM PFDA kombinasyonları şeklinde devam etmiştir. Kültür kaplarının yüzeyinde hücrelerin canlılığı bu dozlarda etkilenmemiştir. Bu bulgular ışığında, ileri çalışmalarla kombinasyon dozlarının, farklı hücre hatlarında da denenmesi önerilmektedir.

Yamamoto ve arkadaşları, PFAS kategorisinden perflorooktanoik asidin (PFOA) 3T3-L1 yağ hücreleri üzerindeki etkisini incelemiş ve PFOA'nın yağ hücresi farklılaşmasını, trigliserit birikimini ve yağ hücresi farklılaşmasıyla ilişkili faktörlerin mRNA düzeyini artırdığını bulmuştur. Düşük dozlar yerine bizim çalışmamızda tercih ettiğimiz dozlara yakın 50 µM, 100 µM ve 200 µM PFOA kullanarak Oil Red-O

boyama ve *PPARγ* ve *C/EBPα* mRNA seviyelerini analiz etmişlerdir. Doz artışına bağlı olarak lipit birikiminde ve ilgili genlerde artış görülmüştür (70). Bizim çalışmamızda da 3T3-L1 hücrelerinde Oil Red-O boyası ile yapılan kantitatif analizler, PFDA'nın bazı dozlarında özellikle 50 µM, 75 µM ve 100 µM uygulamalarında lipit birikimini kontrol grubuna kıyasla artırabileceğini göstermiştir. Absorbans değerleri kontrol grubuna oldukça yakın ya da yüksek bulunmuştur. Bu durum PFDA'nın potansiyel olarak adipojenik bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Wang ve arkadaşlarının çalışmasının sonuçları da PFDA'nın HepG2 ve 3T3-L1 hücrelerinde adipogenezi indüklediği yönündedir. Buna ek olarak yaptıkları trigliserit kantifikasyonu testinde PFDA'nın, hücresel trigliserit birikimini desteklediği ve trigliserit düzeylerini artırdığı yönündedir. Ayrıca çalışmamızda araştırdığımız *SREBF1* ve *FASN* gen ekspresyon düzeylerinin PFDA ile artışı literatürdeki mevcut bilimsel bulgularla örtüşmektedir. Çünkü PFDA uygulanan hücrelerde, PFDA uygulanmayan hücrelere kıyasla konsantrasyona bağlı bir şekilde bu bileşiğin inflamatuar yollar aracılığıyla *SREBF1* ve *FASN* transkripsiyonel seviyelerini arttırdığı rapor edilmiştir (5).

Zhao ve arkadaşları kurkuminin *FASN* inhibitörü gibi davrandığını ve böylece 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşmasını engelleyerek lipit birikimini baskıladığını bildirmiştir (71). Ahn ve arkadaşlarının 3T3-L1 hücreleriyle yaptığı çalışmada kurkuminin *C/EBPα* ve *PPARγ*'nin akış aşağısındaki faktörler olan *SREBF1* ve *FASN*'nin indüksiyonunu baskıladığını Oil Red-O ve western blot analizleriyle sunmuşlardır. Bu bilgilere ek olarak kurkuminin MAPK aktivasyonunu inhibe ettiğini ve farklılaşmış yağ hücrelerinde Wnt/β-katenin sinyallemesini aktive ettiğini gözlemlemişlerdir (46). Çalışmamız, kurkumin tarafından yağ hücresi farklılaşmasının tam olarak engellenmesinin *in vitro* 30 µM'ye kadar konsantrasyonlar gerektirdiğini ileri sürmektedir ve bu çıkarımımız Kim ve arkadaşlarının çalışmasında kullanılan konsantrasyon aralıklarıyla tutarlıdır. Yaptıkları deneyde 10, 20, 30 µM kurkumin konsantrasyonlarıyla çalışmış olup *PPARγ* ve *C/EBPα* mRNA seviyelerini anlamlı bir şekilde azalttıkları görülmüştür (42). Bu sonuçlarla aramızdaki fark, bizim ön deneylerimizde 10 µM kurkumin Oil Red-O boyamada lipit birikiminde anlamlı bir azalış göstermemiştir. Kurkumin tek başına uygulandığında (20 µM, 30 µM, 40 µM ve 50 µM) doza bağlı bir şekilde lipit birikimini anlamlı düzeyde azaltmıştır (Şekil

24). Bu sonuç, kurkuminin adipogenez ve lipogenez süreçlerini baskılayarak lipit birikimini inhibe ettiğine dair literatürdeki bulgularla tutarlıdır. Fakat çalışmamızda 6 kuyuku plakaların yüzeyinde 40 µM ve 50 µM kurkumin sitotoksik etki gösterdiği için çalışmalara 20 µM ve 30 µM kurkumin dozlarıyla devam edilmiştir.

PFDA'nın etkileri ise daha değişken olup; düşük dozlarda nötr ya da sınırlı adipojenik etkilere sahipken, yüksek dozlarda adipogenezi tetikleyebilmektedir. Oil Red-O boyamada kontrole kıyasla kurkuminin hücre içi lipit birikimi baskılayabildiği PFDA'nın ise kontrole yakın ya da kontrolden biraz fazla olduğu gözlenen ancak istatistiksel olarak anlamlı olmayan değerler verdiği görülmüştür (Şekil 24, 26). Çalışmamızın boyama deneyi kısmında PFDA'nın adipojenik etkisi gözlemlenmiş, ancak kurkumin ile birlikte uygulandığında bu olumsuz etkilerin azaldığı ortaya konmuştur.

Kurkuminle ilgili sonuçlarımız literatürdeki mevcut bilgilerle örtüşmekte olup bazı konsantrasyonlarda anlamlı gen baskılamaları göstermiştir. Kontrole kıyasla 30 µM kurkumin çalıştığımız genlerin hepsinde (*PPARγ*, *C/EBPα, SREBF1* ve *FASN*) 20 µM kurkumine göre istatistiksel olarak daha anlamlı inhibisyona yol açmıştır (Tablo 21, 23, 25, 27).

Literatürdeki bulgulara benzer şekilde, çalışmamızda kullanılan belirli PFDA dozlarının (50 µM ve 75 µM) ise kontrole kıyasla 3T3-L1 hücrelerinde hem *SREBF1* düzeylerini hem de onun hedef lipojenik geni olan *FASN* ekspresyonunu yükselttiğini ve bunun sonucunda hücre içi lipit birikimini arttığını ortaya koymuştur (5). Ancak kullandığımız dozların *SREBF1* geninde artış gözlenmesine rağmen bunun anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$). *PPARγ*, *C/EBPα ve FASN* genlerinde ise 75 µM PFDA anlamlı artış göstermesine rağmen 50 µM PFDA'daki artış anlamlı sonuçlanmamıştır ($p>0,05$).

Kurkumin ile kurkumin+PFDA kombinasyonunun birbirleri arasında istatistiksel karşılaştırılmaları çalıştığımız genlerde anlamlı sonuçlar vermemiştir ($p>0,05$). Kurkuminin tek başına oluşturduğu antiadipojenik etkiyi, eklenen PFDA'nın geriye döndürmediği ve baskılanmış bir lipogenez sürecini uyarmadığı bu sonuca göre düşünülmektedir.

PFDA (50 μM ve 75 μM) ile kurkumin+PFDA kombinasyonunun (20/50, 30/50, 20/75 ve 30/75) karşılaştırmasına baktığımızda *PPARγ, C/EBPα* ve *FASN* genlerinde anlamlı bir azalış görülmektedir. *PPARγ*, *C/EBPα* ve *FASN* genleri ortama kurkumin eklenmesiyle baskılanabilmiştir. *SREBF1* geninde ise 20/50 ve 30/50 kombinasyonları azalışa sebep olmasına rağmen bu azalış anlamlı bulunmamıştır. 20/75 ve 30/75 kombinasyonları anlamlı bir azalışa sebep olmuştur. *SREBF1* geninde 20 μM ve 30 μM kurkumin 50 μM PFDA'yı inhibe edemezken 75 μM PFDA'yı baskılayabilmesi şeklinde çıkan sonucun bu gen özelinde yeni çalışmalarla tekrar çalışılarak doğrulanmasının ve başka çalışmalarla ve/veya yöntemlerle sebebinin aydınlatılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, 3T3-L1 hücrelerinde PFDA'nın bazı dozlarının adipogenezi ve lipit birikimini indüklediği ve kurkuminin etkili dozlarıyla muamele sonucunda bu indüksiyonun ve lipit artışının başarıyla baskılanabileceğini düşünmekteyiz. Çevresel kirletici etkenlerle veya kullandığımız gıda kapları ile maruz kaldığımız perflorlu bileşiklerin (PFC) adipojenik genler düzeyinde adipogenezi uyaran yönde oluşturduğu etkiyi antiadipojenik etki yaparak baskılama özelliği gösteren kurkuminin obezite çalışmalarında çok yönlü çalışılması gereken bir terapötik ajan olabileceği değerlendirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 3T3-L1 adiposit hücre hattı kullanılarak kurkumin, PFDA ve her ikisinin kombinasyonlarının hücre içi lipit birikimi üzerine etkileri incelenmiştir. Lipit birikimi, farklılaşmış hücrelerde Oil Red-O boyası ile kantitatif olarak ölçülmüş ve elde edilen veriler istatistiksel analizlerle desteklenmiştir. Bulgular, kurkuminin doza bağımlı olarak lipit birikimini anlamlı şekilde azalttığını, PFDA'nın ise özellikle yüksek dozlarda bu birikimi arttırdığını göstermektedir. Kurkumin ve PFDA'nın birlikte kullanımı ise PFDA'nın lipit artırıcı etkisini baskılayarak lipit birikimini azaltmıştır. Çalışmamızda, adiposit farklılaşmasının ana belirleyicileri olan *PPARγ*, *C/EBPα*, *SREBF1* ve *FASN* genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçülerek hücreye verilen maddelerin gen düzeyindeki etkileri analiz edilmiştir. Aynı zamanda, antiadipojenik özelliklere sahip olduğu bilinen kurkuminin PFDA ile birlikte uygulandığında gen ekspresyon düzeylerinde bir azalma sağlayıp sağlamadığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuç, PFDA'nın adipogenez ve lipogenezde yer alan genlerin ekspresyonunu artırdığı, ancak kurkumin uygulamasının bu artışı baskılayarak potansiyel koruyucu etki gösterebileceğidir. Fakat sonuçlar dozlara göre değişiklik göstermektedir. Farklılaşmış adipositlerde artan lipit birikimi, PFDA'nın obeziteye yol açan mekanizmalardan biri olan adiposit hipertrofisine yol açtığını düşündürebilir. Bu nedenle PFDA'nın preadipositlerin ve adipositlerin aktivitesini bozabileceği sonucuna varılabilir, ancak bu kimyasalın obezite gelişimindeki rolü daha fazla araştırma gerektirmektedir. Yüksek doz kurkuminin, 3T3-L1 preadipositlerinde apoptozu tetiklediği gözlenmiştir. Ancak kurkuminin hücre ölümünü indüklediği moleküler mekanizma bilinmemektedir. Bu sonuç, kurkuminin preadiposit büyümesini engellemesi ve apoptozisi teşvik etmesinin, obezitenin yönetimi için önleyici adımlar olabilir.

Kurkumin ve PFDA'nın kombinasyonları literatürde ilk defa denendiği için bu çalışmayı destekleyici başka çalışmalara ihtiyaç vardır. Ek olarak bu çalışmanın iyi planlanmış *in vivo* çalışmalarla da desteklenmesi gerekmektedir. Giderek artan araştırmalar, çeşitli doğal bileşiklerin yağ oluşumunu engelleyebileceğini, lipolizi teşvik edebileceğini ve ayrıca yağ hücrelerinin apoptozunu başlatabileceğini göstermiştir. Tez çalışmamız, dış etkenler sebebiyle tetiklenen obezitenin yönetiminde kurkuminin terapötik potansiyelini araştırmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Ejaz A, Wu D, Kwan P, Meydani M. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. The Journal of Nutrition. 2009;139(5): 919–925.

2. Jakab J, Miškić B, Mikšić Š, Juranić B, Ćosić V, Schwarz, D, Včev A. Adipogenesis as a Potential Anti-Obesity Target: A Review of Pharmacological Treatment and Natural Products. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity. 2021;14: 67–83.

3. Mu RF, Niu YF, Wang Q, Zhou HM, Hu J, Qin WY, Xiong WY. Eriocalyxin B Inhibits Adipogenesis in 3T3-L1 Adipocytes by Cell Cycle Arrest. Natural Products and Bioprospecting. 2020;10(3): 131–140.

4. Sakuma S, Sumida M, Endoh Y, Kurita A, Yamaguchi A, Watanabe T ve ark. Curcumin inhibits adipogenesis induced by benzyl butyl phthalate in 3T3-L1 cells. Toxicology and Applied Pharmacology. 2017;329: 158–164.

5. Wang T, Xu H, Guo Y, Li Z, Ye H, Wu L ve ark. Perfluorodecanoic acid promotes adipogenesis via NLRP3 inflammasome-mediated pathway in HepG2 and 3T3-L1 cells. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2023;171: 113520.

6. Alalaiwe A, Fang JY, Lee HJ, Chiu CH, Hsu CY. The Demethoxy Derivatives of Curcumin Exhibit Greater Differentiation Suppression in 3T3-L1 Adipocytes Than Curcumin: A Mechanistic Study of Adipogenesis and Molecular Docking. Biomolecules. 2021;11(7): 1025.

7. Tong Q, Tsai J, Tan G, Dalgin G, Hotamisligil GS. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. Molecular and Cellular Biology. 2005;25(2): 706–715.

8. Jamal N, Zainol NI, Zakaria NA, Jofrry SM, Mohamed R, Man F, Choo C. Safety, efficacy, and mechanism of action of herbs used for obesity management: A thematic review. Obesity Medicine. Elsevier Ltd. 2022;32: 100415.

9. Behera PK, Devi S, Mittal N. Therapeutic potential of gallic acid in obesity: Considerable shift! Obesity Medicine. Elsevier Ltd. 2023;37: 100473.

10. Flores-Dorantes MT, Díaz-López YE, Gutiérrez-Aguilar R. Environment and Gene Association With Obesity and Their Impact on Neurodegenerative and Neurodevelopmental Diseases. Frontiers in Neuroscience. 2020;14: 863.

11. World Health Organization. Obesity and overweight. [İnternet]. 2025 [Erişim Tarihi 2 Temmuz 2025]. Erişim adresi: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight

12. Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. Nature Reviews. Molecular cell biology. 2006;7(12): 885–896.

13. Peng H, Lin X, Wang Y, Chen J, Zhao Q, Chen S ve ark. Epigallocatechin gallate suppresses mitotic clonal expansion and adipogenic differentiation of preadipocytes through impeding JAK2/STAT3-mediated transcriptional cascades. Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology. 2024; 129: 155563.

14. Molonia MS, Salamone FL, Muscarà C, Costa G, Vento G, Saija A ve ark. Regulation of mitotic clonal expansion and thermogenic pathway are involved in the antiadipogenic effects of cyanidin-3-O-glucoside. Frontiers in Pharmacology. 2023;14: 1225586.

15. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. Annual Review of Biochemistry. 2014;81: 715–736.

16. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. Genes & Development. 2002;16(1): 22–26.

17. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 2000;16: 145–171.

18. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. Cell. 2007;131(2): 242–256.

19. Moseti D, Regassa A, Kim, WK. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. Int. J. of Mol. Sci. 2016;17(1): 124.

20. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. Anal Biochem. 2012;425(1):88-90.

21. Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. Nature Reviews. Molecular Cell Biology. 2011;12(11): 722–734.

22. Pparg peroxisome proliferator activated receptor gamma. Mus musculus (house mouse) [İnternet]. 2025. [Erişim Tarihi 23.02.2025]. Erişim adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19016

23. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. Genes & Development. 2000;14(11): 1293–1307.

24. Tong Q, Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of adipocyte differentiation. Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders. 2001;2(4): 349–355.

25. Aranaz P, Navarro-Herrera D, Zabala M, Miguéliz I, Romo-Hualde A, López-Yoldi M ve ark. Phenolic Compounds Inhibit 3T3-L1 Adipogenesis Depending on the Stage of Differentiation and Their Binding Affinity to PPARγ. Molecules. 2019;24(6):1045.

26. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K ve ark. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. The Journal of Clinical Investigation. 1998;101(6): 1354–1361.

27. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME ve ark. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. The Journal of Biological Chemistry. 2006;281(5): 2654–2660.

28. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM. 2009;20(3): 107–114.

29. Cebpa CCAAT/enhancer binding protein alpha Mus musculus (house mouse) [İnternet]. 2025. [Erişim Tarihi 23.02.2025]. Erişim adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12606

30. SREBF1 sterol regulatory element binding transcription factor 1 Mus musculus (house mouse) [İnternet]. 2025. [Erişim Tarihi 23.02.2025]. Erişim adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20787

31. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell. 1997;89(3): 331–340.

32. Ji S, Doumit ME, Hill RA. Regulation of Adipogenesis and Key Adipogenic Gene Expression by 1, 25-Dihydroxyvitamin D in 3T3-L1 Cells. PloS One. 2015;10(6): e0126142.

33. Ayala-Sumuano JT, Velez-Delvalle C, Beltrán-Langarica A, Marsch-Moreno M, Cerbón-Solorzano J, Kuri-Harcuch W. SREBF1a is a key regulator of transcriptional control for adipogenesis. Scientific Reports. 2011;1: 178.

34. Tontonoz P, Kim J B, Graves RA, Spiegelman BM. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. Molecular and Cellular Biology. 1993;13(8): 4753–4759.

35. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. Genes & Development. 1996;10(9): 1096–1107.

36. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. Journal of Clinical Investigation. 2002;109(9): 1125–1131.

37. FASN fatty acid synthase Mus musculus (house mouse) [İnternet]. 2025. [Erişim Tarihi 23.02.2025]. Erişim adresi: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14104

38. Moustaïd N, Sul HS. Regulation of expression of the fatty acid synthase gene in 3T3-L1 cells by differentiation and triiodothyronine. The Journal of Biological Chemistry. 1991;266(28): 18550–18554.

39. Ha JH, Jang J, Chung SI, Yoon Y. AMPK and SREBP-1c mediate the anti-adipogenic effect of β-hydroxyisovalerylshikonin. International Journal of Molecular Medicine. 2016;37(3): 816–824.

40. Thomas SS, Eom J, Sung NY, Kim DS, Cha YS, Kim KA. Inhibitory effect of ethanolic extract of Abeliophyllum distichum leaf on 3T3-L1 adipocyte differentiation. Nutrition Research and Practice. 2021;15(5): 555–567.

41. Jang J, Jung Y, Seo SJ, Kim SM, Shim YJ, Cho SH ve ark. Berberine activates AMPK to suppress proteolytic processing, nuclear translocation and target DNA binding of SREBP-1c in 3T3-L1 adipocytes. Molecular Medicine Reports. 2017;15(6):4139–4147.

42. Kim CY, Le TT, Chen C, Cheng JX, Kim KH. Curcumin inhibits adipocyte differentiation through modulation of mitotic clonal expansion. J Nutr Biochem. 2011;22(10):910-20.

43. Wu LY, Chen CW, Chen LK, Chou HY, Chang CL, Juan CC. Curcumin Attenuates Adipogenesis by Inducing Preadipocyte Apoptosis and Inhibiting Adipocyte Differentiation. Nutrients. 2019;11(10):2307.

44. Zhao Y, Chen B, Shen J, Wan L, Zhu Y, Yi T, Xiao Z. The Beneficial Effects of Quercetin, Curcumin, and Resveratrol in Obesity. Oxid Med Cell Longev. 2017;1459497.

45. Zhao D, Pan Y, Yu N, Bai Y, Ma R, Mo F ve ark. Curcumin improves adipocytes browning and mitochondrial function in 3T3-L1 cells and obese rodent model. Royal Society Open Science. 2021;8(3): 200974.

46. Ahn J, Lee H, Kim S, Ha T. Curcumin-induced suppression of adipogenic differentiation is accompanied by activation of Wnt/beta-catenin signaling. American journal of physiology. Cell Physiology. 2010;298(6): C1510–C1516.

47. Chang E, Kim CY. Natural Products and Obesity: A Focus on the Regulation of Mitotic Clonal Expansion during Adipogenesis. Molecules. 2019; 24(6): 1157.

48. Wang T, Xu H, Guo Y, Guo Y, Guan H, Wang D. Perfluorodecanoic acid promotes high-fat diet-triggered adiposity and hepatic lipid accumulation by modulating the NLRP3/caspase-1 pathway in male C57BL/6J mice. Food Chem Toxicol. 2023;178:113943.

49. Zhang L, Ren XM, Guo LH. Structure-based investigation on the interaction of perfluorinated compounds with human liver fatty acid binding protein. Environmental Science & Technology. 2013;47(19): 11293–11301.

50. Timmermann CA, Rossing LI, Grøntved A, Ried-Larsen M, Dalgård C, Andersen LB ve ark. Adiposity and glycemic control in children exposed to perfluorinated compounds. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2014;99(4): E608–E614.

51. Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. Exp Biol Med. 2001; 226 (11): 997–1002.

52. Türküner MS. Effects of monosodium glutamate on 3T3-L1 preadipocyte differentiation [yüksek lisans tezi]. Gebze: Gebze Teknik Üniversitesi; 2017.

53. Erkekoğlu P, Baydar T. Güncel in vitro sitotoksisite testleri. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy. 2021; 41: 45-63.

54. Ramírez-Zacarías JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. Histochemistry. 1992;97(6): 493–497.

55. Kraus NA, Ehebauer F, Zapp B, Rudolphi B, Kraus BJ, Kraus D. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. Adipocyte. 2016;5(4):351-358.

56. Yamamoto J, Yamane T, Oishi Y, Kobayashi-Hattori K. Perfluorooctanoic acid binds to peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2015;79(4): 636–639.

57. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nature Protocols. 2008;3(6): 1101–1108.

58. MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. Annual Review of Biochemistry. 1995;64: 345–373.

59. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. Cell Metabolism. 2006;4(4): 263–273.

60. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. Cell. 1975;5(1): 19–27.

61. Cytion. 3T3-L1 Cell Line: A Key to Understanding Obesity. [İnternet]. [Erişim Tarihi 13 Temmuz 2025]. Erişim adresi: https://www.cytion.com/The-3T3-L1-Cell-Line-A-Key-to-Understanding-Obesity

62. Vohra MS, Ahmad B, Serpell CJ, Parhar IS, Wong EH. Murine in vitro cellular models to better understand adipogenesis and its potential applications. Differentiation; Research in Biological Diversity. 2020;115: 62–84.

63. Zhao X, Hu H, Wang C, Bai L, Wang Y, Wang W, Wang J. A comparison of methods for effective differentiation of the frozen-thawed 3T3-L1 cells. Analytical Biochemistry. 2019;568: 57–64.

64. Watkins AM, Wood CR, Lin MT, Abbott BD. The effects of perfluorinated chemicals on adipocyte differentiation in vitro. Molecular and Cellular Endocrinology. 2015;400: 90–101.

65. Environmental Factor. PFAS exposure may interfere with dieting success. [İnternet]. [Erişim Tarihi 14 Temmuz 2025]. Erişim adresi: https://factor.niehs.nih.gov/2023/7/papers/dert#a1

66. Grandjean P, Meddis A, Nielsen F, Sjödin A, Hjorth MF, Astrup A, Budtz-Jørgensen E. Weight loss relapse associated with exposure to perfluorinated alkylate substances. Obesity. 2023;31(6): 1686–1696.

67. Modaresi SMS, Wei W, Emily M, DaSilva NA, Slitt AL. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) augment adipogenesis and shift the proteome in murine 3T3-L1 adipocytes. Toxicology. 2022;465: 153044.

68. Pelch KE, Reade A, Wolffe TAM, Kwiatkowski CF. PFAS health effects database: Protocol for a systematic evidence map. Environment International. 2019;130: 104851.

69. Bjork JA, Wallace KB. Structure-activity relationships and human relevance for perfluoroalkyl acid-induced transcriptional activation of peroxisome proliferation in liver cell cultures. Toxicological Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology. 2009;111(1): 89–99.

70. Yamamoto J, Yamane T, Oishi Y, Kobayashi-Hattori K. Perfluorooctanoic acid binds to peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2015;79(4): 636–639.

71. Zhao J, Sun XB, Ye F, Tian WX. Suppression of fatty acid synthase, differentiation and lipid accumulation in adipocytes by curcumin. Molecular and Cellular Biochemistry. 2011;351(1-2): 19–28.

8. EKLER

EK 1: Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul Onayı

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	**goaek@deu.edu.tr**

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	8404-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐	
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**Kurkumin'in, 3T3-L1 Hücrelerinde Perflorodekanoik Asit (PFDA) Tarafından İndüklenen Adipogenez Süreci Üzerine Etkisi**	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr. Yasemin Soysal Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	
	TEZ SAHİBİNİ ADI SOYADI	Ayten DARCAN	
	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:2023/34-10**	**Tarih:25.10.2023**
	Doç.Dr. Yasemin Soysal'ın sorumlusu olduğu **"Kurkumin'in, 3T3-L1 Hücrelerinde Perflorodekanoik Asit (PFDA) Tarafından İndüklenen Adipogenez Süreci Üzerine Etkisi"** isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın mevcut haliyle etik yönden 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.Mehmet Birhan Yılmaz (Başkan)	Kardiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Şükran Köse (Başkan Yardımcısı)	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	DEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Ahmet Okay Çağlayan	Moleküler Tıp	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Aylin Özgen Alpaydın	Göğüs Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Özgür Er	Endodonti A.D.	Diş Hekimliği Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Hatice Şimşek Keskin	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Seher Özyürek	Muskuloskeletal Fizyoterapi	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu Aksay	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Meryem Öztürk Haney	Halk Sağlığı Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr. Şule Özbilgin	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	DEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Tolga Şahin	Spor Yönetim Bilimleri	Necat Hepkon Spor Bilimleri Fakültesi	Erkek	E ☐	H ☒	
Dr.Öğr.Üyesi Gamze Tuna	Tıbbi Biyokimya	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Kadın	E ☐	H ☒	

KATKI

Bu tez projesi Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2024-3460 proje numarası ile desteklenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ



AYTEN DARCAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası www.linkedin.com/in/ayten-darcan-1b091b278/

Öğrenim Bilgileri

09 Eylül 2022 - Şu Anda (3 yıl)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (YL) (TEZLİ)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.71 / 4.0

17 Ağustos 2016 - 22 Temmuz 2020 (4 yıl)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PR.
Diploma Numarası: 01-0010395
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.18 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

Haziran 2019 - Temmuz 2019 (2 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, SAĞLIK BAKANLIĞI TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU BAŞKANLIĞI AYDIN İLİ KAMU HASTANE BİRLİĞİ GENEL SEKRETERLİĞİ AYDIN DEVLET HASTANESİ

Yabancı Dil Bilgileri

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

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

ALMANCA (Okuma: Başlangıç, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Anahtar Kelimeler

Hücre Biyolojisi

Moleküler Biyoloji Ve Genetik

Ar-Ge Yetkinlik

Bildiriler

A. DARCAN, Y. SOYSAL & E. N. ÇİL, CURCUMIN'S ANTI-ADIPOGENIC EFFECTS ON PLASTICIZING AGENT PERFLUORODECANOIC ACID: IN VITRO STUDY, Poster Sunumu, Bridging Continents to Advance Life Science, 49th FEBS Congress, 05 Temmuz 2025, 09 Temmuz 2025, 67 - 527.

A. DARCAN, Effect of Curcumin on Adipogenesis Process in 3T3-L1 Cellular Model, Poster Sunumu, X. INTERNATIONAL CONGRESS OF MOLECULAR MEDICINE, 23 Eylül 2024, 27 Eylül 2024.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı				ULDB	TEYDEB	Toplam
Görev	ARDEB	BİDEB	BİLİM TOPLUM			
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
Katılmadığı Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	0	0	0	0	0	0